UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1929/1930 N° 52

RECHERCHES BIOCHIMIQUES SUR LE GRASSBACILLUS II

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 15 juillet 1930
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le Grade de Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

par

Mr. C. GEORGESCU VIOREL, Pharmacien
de la
Faculté de Pharmacie, Bucarest.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE :

MM. E. LABORDE, Professeur, *Président*
F. JADIN, „ *Juges*
E. LOBSTEIN, „ *Juges*

STRASBOURG
SOCIÉTÉ STRASBOURGEOISE DE LIBRAIRIE
«SOSTRALIB»
14, Place de la Cathédrale, 14

1930

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1929/1930 N° 52

RECHERCHES BIOCHIMIQUES SUR LE GRASSBACILLUS II

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 15 juillet 1930
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le Grade de Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

par

Mr. C. GEORGESCU VIOREL, Pharmacien
de la
Faculté de Pharmacie, Bucarest.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE : MM. E. LABORDE, Professeur, *Président*
F. JADIN, „ *Juges*
E. LOBSTEIN, „ *Juges*

STRASBOURG
SOCIÉTÉ STRASBOURGEOISE DE LIBRAIRIE
«SOSTRALIB»
14, Place de la Cathédrale, 14

1930

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

ADMINISTRATION

MM. JADIN, *Doyen*, ✻, ☤ I, ⚕.
SARTORY, *Assesseur*, ✻ C, ☤ I. ⚕.
CUVIER, *Secrétaire*.

PROFESSEURS

MM.	JADIN, ✻, ☤ I, ⚕	Pharmacie chimique
	A. SARTORY, ✻ C, ☤ I, ⚕	Bactériologie.
	LAVIALLE, ☤ I, ⚕	Botanique.
	LABORDE, ☤ I	Chimie organique.
	VOLMAR, ☤ I	Analyse chimique.
	LOBSTEIN, ✻, ❁, ☤ I...	Matière médicale.

CHARGÉ DE COURS

M. GUILLAUME..... Pharmacie galénique.

PROFESSEUR HONORAIRE

M. BRÆMER, ✻, ☤ I, O ⚕..

COURS COMPLÉMENTAIRES

MM.	LABORDE, ☤ I.....	Chimie biologique.
	VOLMAR, ☤ I	Chimie minérale.
	LOBSTEIN, ✻, ❁, ☤ I...	Hydrologie et Hygiène.
	GUILLAUME.....	Zoologie.
	BRÆMER, ✻, ☤ I, O ⚕ ...	Législation et Déontologie.
	LAPP, ☤	Physique.
	COLLARD, ❁, ☤	Toxicologie.
	R. SARTORY.....	Cryptogamie.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	LAPP, ☤.....	Chimie pharmaceutique.
	COLLARD, ❁, ☤	Chimie et Physique.
	GARNIER, ❁, ☤	Histoire naturelle.
	R. SARTORY.....	Bactériologie et Parasitologie.

A Monsieur le Professeur E. LABORDE

En témoignage de ma vive reconnaissance.

A mes anciens Professeurs de la Faculté de Pharmacie de Bucarest.

Pharmacie chimique:
M. GEORGESCU, Dr ès-sciences, Paris.
Botanique générale:
Th. SOLACOLU, Dr ès-sciences, Paris.
Chimie analytique:
N. DELEANU, Dr ès-sciences, Genève;
Chimie organique:
S. MINOVICI, Dr ès-sciences, Berlin.
Chimie biologique-Toxicologie:
Al. JONESCU-MATIU, Dr ès-sciences, Paris
Gh. DUMITRESCU, Dr ès-sciences, Genève.
Chimie alimentaire:
J. VINTILESCU, Dr ès-sciences, Paris.
Botanique appliquée:
M. BRANZA, Dr ès-sciences, Paris.
Matière médicale:
C. KOLLO, Dr en pharmacie, Bucarest.
Pharmacie galenique:
Ar. MIHALOVICI, Dr en pharmacie, Bucarest.
Analyse de médicaments:
CIOGOLEA, Dr en pharmacie, Bucarest.
Physique:
C. STATESCU, Dr ès-sciences, Bucarest.
Bacteriologie et Hygiène:
OLINESCU, Dr en médicine, Bucarest.
Législation et Déontologie:
Al. ITEANU, Dr en pharmacie, Bucarest.

Faculté de Médicine et Pharmacie Cluj.

Pharmacie chimique et galenique, Chimie organique et anorganique:
Gh. PAMPHIL, Dr ès-sciences, Genève.
Botanique appliquée:
Al. BORZA, Dr ès-sciences.

Homage de ma profonde reconnaissance.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE
mort pour la patrie
le 12 Novembre 1916 à Slatina-Roumanie

A MA FEMME

A MA MÈRE ET A MES BEAUX-PARENTS

A MM. Prof. C. D. FORTUNESCU et ING, Drs en Chimie
P. MOJOIU

A mon pays la Grande Roumanie

et

à la France, notre sœur Latine

toute ma reconnaissance.

INTRODUCTION

Le GRASS-BACILLUS se trouve dans la poussière sèche des herbes, dans celle des greniers à fourrage — *Mœller* a obtenu (1898) des cultures de ce bacille en ensemençant de la poussière de foine sur des plaques de gélatine.

Ces bacilles se présentent sous la forme de bâtonnets de 1 à 5 μ de long, sur 0,2 à 0,4 μ de largeur.

Ils sont souvent légèrement courbés et sont fréquemment accolés en y. Dans les cultures sur milieux solides, on trouve facilement des formes ramifiées ou des éléments renflés en massue. Les cultures dans le lait montrent des formes coccotrix. Dans les jeunes cultures on trouve facilement des bâtonnets nettement mobiles. Le *Grass-Bacillus* est un acido-résistant qui peut être mis en évidence par un frotis de coloration d'après la méthode de *Ziehl-Nielsen.* Il se colore par la méthode de *Gram.* Comme le bacille de *Koch,* il résiste bien à la décoloration par les acides et l'alcool fort. C'est là aussi pour lui un caractère spécifique et toujours héréditaire. La forme change un peu avec la composition du milieu. On peut dire qu'il se modifie avec la nature des hydrates de carbone. Les cultures sont faciles à obtenir et se développent surtout bien entre 36°—37°, moins vite à la température du laboratoire soit 18° à 20°.

Dans la Gélose Glycérinée. — Le développement est très abondant à 37°. Après deux jours *Mœller* trouve des petites colonies en forme de gouttelettes d'eau qui ne tardent pas à fusionner pour donner un revêtement jaunâtre.

Dans le liquide sous-jacent, qui reste toujours limpide, se forment des grumaux d'un blanc jaunâtre qui se déposent à un moment donné .

Dans la gélatine. — En 4—5 jours, vers 20°, on a une culture assez abondante blanc-grisâtre ou un peu jaunâtre. La gélatine n'est pas liquifiée.

Dans le sérum coagulé, la culture est blanc grisâtre et reste assez faible.

Dans la pomme de terre glycérinée. — A 37°, la culture est rapide et abondante; c'est un épais revêtement blanchâtre, humide; dans le liquide situé au-dessous du revêtement, il se forme un voile blanc, épais, plissé.

Dans le bouillon glycériné, il se forme un voile grisâtre ou un peu jaunâtre, qui se fragmente facilement. Le liquide reste clair et ne possède aucune odeur.

Dans le lait, le développement est très rapide; la réaction devient assez vite acide. Il se forme à la surface une pellicule fragile, le liquide prend une teinte brunâtre et ne se coagule pas. L'inoculation intrapéritoneale de ce liquide tue le cobaye au bout de 4—6 semaines, avec des cultures dans le lait le délai n'est que de dix à vingt jours. Les résultats obtenus sont très semblables à ceux que donne le *Grass-Bacillus I*[er]. Le *Grass-Bacillus II* paraît cependant moins virulent.

Freymuth dit avoir obtenu avec ce dernier une véritable maladie avec production de tubercules. Le même auteur a observé chez les animaux à sang froid: grenouilles, crapauds, lézards, des lésions très semblables à celles qu'y produisent le bacille aviaire et le bacille pisciaire.

Si au point de vue bactériologique, le *Grass-Bacillus* II a été étudié avec soin, il n'a fait l'objet d'aucune recherech chimique.

Me plaçant donc surtout sur le terrain biologique, j'ai cultivé le bacille sur des milieux chimiquement définis aussi simples que possible — d'ailleurs, sans qu'aucun

d'eux fut nécessairement le milieu optimum. J'ai étudié l'utilisation par le *Grass-Bacillus II* de diverses matières azotées ainsi que celle des hydrates de carbone. J'ai étudié aussi les variations des matières grasses du *Grass-Bacillus II*, après culture sur des milieux différents: Glycérine, Glucose, Glycérine et Glucose, en vue de déterminer si les corps gras formés par ce bacille varient en qualité et en quantité.

J'ai recherché en outre les variations des matières alluminoïdes et phosphorées après culture sur les mêmes milieux: Glycerine, Glucose, et Glycerine et Glucose.

Ce travail est divisé en 2 chapitres:

1) Dans le premier chapitre j'ai étudié la culture de *Grass-Bacillus II* sur des milieux chimiques définis au point de vue du rendement, en fonctions de diverses alimentations: azotée, ternaire et aussi l'influence de réaction du milieu sur le développement de la culture.

Le chapitre II[e] est consacré à l'étude de la composition chimique du *Grass-Bacillus* et aux variations de cette composition sous l'influence des milieux nutritifs et de l'âge des cultures.

Ces recherches ont été effectuées dans *le laboratoire de Chimie Organique et Biologique* de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg. Avant de les exposer nous voulons exprimer à notre maître, *Monsieur le Professeur E. Laborde*, qui a bien voulu nous donner le sujet de cette thèse, notre respectueuse gratitude pour l'intérêt avec lequel il a guidé notre travail, ses précieux conseils, ses encouragements et aussi l'empressement avec lequel il a mis à notre disposition tous les appareils et produits nécessaires. Nous conserverons un bon souvenir du temps passé dans son laboratoire. Qu'il veuille bien recevoir ici l'hommage de notre reconnaissance.

C'est pour nous un devoir bien agréable à remplir que celui d'exprimer à Monsieur le *Doyen Jadin* tous nos sentiments de respectueuse reconnaissance pour

l'accueil si aimable que nous avons reçu de lui et pour l'honneur qu'il nous fait d'accepter de faire partie du Jury de cette thèse. Nous en garderons un souvenir durable.

Nous prions aussi M. le Professeur *E. Lobstein* d'agréer nos plus vifs remerciements pour l'intérêt qu'il n'a cessé de nous témoigner au cours de ce travail et qu'il veut bien nous continuer en acceptant de faire partie du Jury de notre thèse.

Nous remercions Monsieur le Professeur *A. Sartory*, Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie qui a bien voulu mettre à notre disposition les appareils nécessaires à la culture des bacilles qui ont servi à nos expériences. Nos remerciements s'adressent aussi aux collaborateurs du Professeur Sartory, MM. *R. Sartory*, Chargé de cours et *Mayer*, Assistant qui ont bien voulu contrôler, pendant la durée de notre travail la pureté des cultures de nos bacilles.

Nous adressons également tous nos sentiments de gratitude à M. le Professeur *E. Terroine* qui nous a fait bénéficier largement de sa grande expérience dans le dosage si délicat et si précis des corps gras.

Nous remercions très cordialement *M. Bonnet*, Dr. ès-Sciences, chargé du cours de Physique Biologique de la Faculté des Sciences de Strasbourg, qui a bien voulu nous aider de ses précieux conseils au cours de nos recherches.

CHAPITRE I

Culture du GRASS-BACILLUS II sur milieu chimique défini.

La composition d'un milieu nutritif artificiel capable de donner le poids maximum de culture est difficile à établir. Pour atteindre ce but, on ne doit pas se baser sur l'analyse qualitative et quantitative des cendres des bacilles, en raison de ce fait qu'on est exposé à laisser échapper à l'analyse les corps qui ne se trouvent qu'à l'état de traces et par suite le résultat n'est pas rigoureusement exact. Par conséquence, il n'est possible de résoudre le problème que par voie syntéthique et après plusieurs essais. Le critérium du développement optimum (qui n'est pas le développement normal) est le poids du bacille sec; après avoir obtenu ce développement optimum, on fait varier les composants du milieu en notant chaque fois le poids des bacilles obtenus. On a ainsi des nombres comparatifs. C'est l'application de la technique employée par *Raulin* sur le *Sterigmatocystis nigra.*

Chez les végétaux supérieurs le problème de la nutrition est relativement simple grâce à la fonction chlorophylienne; ils fixent l'acide carbonique et assimilent le carbone; ils n'exigent pas de substances azotées complexes.

Les travaux de *Boussingault, Muntz* et *Mazé,* les recherches de *Molliard,* de *Lefèvre,* de *Laurent* et de *Marchal* ont montré que parmi les trois formes d'azote: *azote nitrique, azote ammoniacal* et *azote à l'état*

organique, l'azote nitrique et les sels ammoniacaux sont parfaitement utilisés (surtout les azotates) et que parmi les composés azoztés organiques, seules les substances qui renferment une fonction amide telles que: l'*asparagine*, l'*Urée* etc. peuvent être assimilées sous l'action de l'énergie solaire, les amines et les acides aminés n'étant pas en milieu aseptique. *Boussingault* a montré aussi que l'azote atmosphérique n'est pas utilisé par les végétaux supérieurs, mais *Hellriegell* et *Wilfarth* disent que les végétaux qui assimilent l'azote atmosphérique n'effectuent cette assimilation qu'indirectement par l'intermédiaire de microorganismes, formant avec eux une association symbiotique.

L'alimentation minérale exclusive fut méconnue jusqu'en 1840. A cette époque *Liebig* affirma leur nécessité absolue et en 1842 *Wiegmann* et *Polstorff*, appliquant la méthode des cultures sur sable, faisaient connaître le rôle essentiel des principes minéraux dans la végétation. Les études de *Sachs, Knop, Stochmann, Nobbe, Oltmanns*, ont démontré qu'en outre de l'*hydrogène*, de l'*oxygène*, de l'*azote* et du *carbone* sont indispensables pour un développement normal du végétal: le *phosphore*, le *soufre*, le *potassium*, le *calcium*, le *magnésium*. En outre, suivant les espèces, tel élément devra être dominant. D'après les travaux de *G. Bertrand*, la présence de Manganèse au moins à l'état de traces, est nécessaire pour l'organisme végétal ou animal, dans lesquels il joue un rôle essentiel dans les phénomènes d'oxydation. Le bore interviendrait aussi utilement dans la croissance des végétaux, d'après *Agulhon*.

Bertrand se demande si les six corps simples énoncés plus haut sont suffisants; si d'autres corps que l'analyse chimique n'a pas permis de déceler encore, ne sont pas moins nécessaires et si ces substances ne se trouvent pas à l'état d'impuretés dans ces composées chimiques. Chez les végétaux inférieurs, les recherches

ont été beaucoup plus nombreuses et plus précises, en raison de la rapidité avec laquelle ces êtres se développent, en raison aussi des conditions expérimentales et encore en raison de ce fait que l'apport de l'aliment réalisé par la minime quantité de matière ayant servi à l'ensemencement, peut être considéré comme négligeable. Les recherches mémorables de *Raulin* effectuées de 1864—1870 sur les *stérigmatocystis* et qui servent de modèle pour l'étude du développement des champignons, montrent que la moindre modification apportée à la composition du liquide dont il se servait (Liquide de *Raulin*) amenait des modifications dans le corps du champignon soumis à ces expériences. La composition de ce liquide est si bien choisie que les *stérigmatocystis* s'y développent en formant une culture pure, abondante et que tous les autres microorganismes y sont détruits. *Raulin* reconnut indispensables au développement de cette moissure les éléments suivants: Phosphore, soufre, Potassium, Magnesium, Fer, Zinc, Silicium et Calcium. Comme ici il n'y a pas d'assimilation chlorophyleienne, il faut au *Stérigmatocystis* un aliment hydrocarboné, qui lui apportera le carbone nécessaire — et *Raulin* choisit le saccharose. L'azote a été fourni sous la forme des sels ammoniacaux (azote, phosphate et sulfate d'ammonium) et la fixation d'azote se fait d'après lui, sous l'influence de l'énergie apportée par l'aliment hydrocarboné.

La partie la plus intéressante des travaux de *Raulin* fut l'explication du rôle des éléments secondaires (Fer, Zinc) qui agissent d'après lui comme catalyseurs. Ces résultats ont été contestés par *Coupin* et par *Lepierre* mais par contre ils ont été confirmés par *Javillier* et ce dernier a constaté que 0,8 gr. de Zinc par litre, permettent de doubler la récolte. D'après *Javillier* le zinc, fixé par les cellules du *stérigmatocystis* réduirait les dépenses d'entretien en hydrates de Carbone

et en azote ammoniacal, en faveur de la construction de nouveaux tissus.

Dans les cendres les proportions de soufre et de magnesium diminuent, tandis que celles de phosphore, de silicium et de fer augmentent.

G. Bertrand a montré que la manganèse dans la proportion d'un décimilliardème augmente la récolte de plus de la moitié. *Bertrand* et *Javillier* ont montré aussi que le cuivre, le glucinium, l'uranium et le Cadmium se comportent de même. Pour les bactéries, qu'elles soient aérobies ou anaérobes, les milieux de culture, solides ou liquides doivent contenir: des matières azotées, des matières hydrocarbonées et des sels minéraux, parce que les microbes sont constitués par ces trois catégories de substances. Lorsqu'on fait l'analyse des cendres de ces microorganismes, on y constate toujours la présence du soufre, du potassium, du magnesium et du phosphore. Et ces éléments sont indispensables au développement normal des levures, des moissures et des végétaux supérieurs.

Pichard et plus tard *Deheran* signalèrent l'action favorisante des sels de chaux sur le développement des bactéries nitrifiantes. Ce fut *Pasteur* qui imagina de cultiver les bactéries dans des solutions salines, les sels étant fournis par des cendres de levûre. En se basant sur ces observations *Cohn* a préparé un milieu chimique défini constitué par des corps simples en quantités variables, suivant l'espèce du microbe étudié. Très variable est la nature des aliments azotés organiques choisis. L'aliment azoté peut être: la peptone ou ses produits de désintégration (acides aminés, asparagine, leucine) ou bien des corps azotés déjà minéralisés (nitrates et sels ammoniacaux). *Arnaud* et *Charrin* (1891) s'étaient servis de milieux contenant des sels minéraux et de l'asparagine.

Ouichinsky (1893) a employé pour les microbes de la diphtérie et du choléra des milieux synthétiques contenant: glycérine, lactate d'ammonium et asparagine. Il faut reconnaître que ces milieux ont été créés pour les besoins bactériologiques et non pour l'étude chimique, des milieux de cultures.

Pour le bacille tuberculeux on trouve dans la littérature de nombreuses formules de milieux, parce que comme dit *Grimbert,* il y a presque autant de manières de préparer ces milieux, qu'il y a de laboratoires et d'autre part qu'à côté des bactériologistes, des chimistes ont étudié ce bacille.

D'une manière générale les milieux sont constitués par du bouillon de viande glycériné-peptoné, Chlorure de potassium, Phosphate dipotassique, du monophosphate de magnésium, du glucose, des dextrines, de l'urée.

Liebig y décela de la créatine et créatinine, de l'acide inosique, de l'acide sarcolastique. *Gautier* y trouva toute une série de ptomaines: Xantocréatine, chrystocréatinine, amphycréatinine, pseudoxanthine etc.

En Allemagne, dans le laboratoire de *Koch* on a reconnu comme éléments minéraux indispensables: le phosphore, le potassium, le magnésium, le chlore sous la forme de chlorure de sodium; l'aliment azoté était fourni sous la forme minérale ou organique et l'alimentation hydrocarbonnée était assurée par la glycérine à laquelle furent ajoutés tantôt des sucres, tantôt des acides organiques ou des alcools polyatomiques, mais la glycérine a été reconnue indispensable.

En même temps des recherches méthodiques et précises furent poursuivies en France par: *Calmette, Massol* et *Breton* (1909). Ces auteurs ont étudié la valeur alimentaire des diverses substances azotées ajoutées aux milieux chimiques définis, contenant soit de la glycérine, soit du glucose, soit les deux. Comme aliment azoté, ils préconisent la peptone (10 gr. p. ‰) l'asparagine, ou la succi-

nimide (2.5 gr. p. ‰) et comme substance ternaire la glycérine (40 p. ‰) le glucose (10 gr. p. ‰) en remplacement de la glycérine. Avec le glucose seul la récolte est diminuée de moitié, mais son addition à la glycérine double presque le rendement.

Baudran (1909—1910) cultive le bacille tuberculeux dans des Glycérophosphates: de potassium, de sodium, de Calcium, de Magnésium, additionnés d'Albumose et de Glycérine. La présence de Glycerophosphate de Fer ou de Manganèse modifie la morphologie et la virulence du bacille. *A. Delille, Mayer, Schæffer* et *Terroine* (1912—1913) procédant par voie analytique, constatent, contrairement à *Raulin*, que la culture sur bouillon de viande sans peptone est faible, parfois nulle, que les solutions de peptone additionnées de sels et de glycérine donnent une récolte dont la richesse varie avec la nature de la peptone employée: moyenne avec la peptone de *Chapoteaut* et la peptone de *Vitte*, très pauvre avec la peptone de soie et, qu'en général, le rendement est inférieur à celui obtenu avec le bouillon peptoné. Enfin ils ont obtenu avec de la peptone préparée avec la chair musculaire soit par action diastasique, soit par l'acide chlorhydrique une récolte très abondante, même si on ajoute de la peptone commerciale et ils expliquent ces résultats d'après la teneur de la peptone en acides aminés (peptone de soie d'abord, puis peptone de *Vitte* et après peptone de *Chapoteaut*).

Partant de ces résultats, ils composèrent un bouillon de viande synthétique auquel ils ajoutent: des sels minéraux, des ac. aminés, des matières extractives, puis du Glucose, de la glycérine et de l'inosite comme substances ternaires et il se produisit un voile épais au bout de 15 jours (milieu 104).

En 1913, ils préparèrent un autre milieu plus simple (milieu 164), mais qui donne des cultures aussi belles et aussi rapides en 8 jours. Ce milieu contient les mêmes

sels minéraux, du glycocolle (acide monoaminé) comme substance azotée et l'arginine (acide diaminé) en remplacement des substances extractives. Donc, en résumé, le bacille tuberculeux contrairement aux plantes vertes, assimile très bien les acides aminés. *Sauton* partant d'un milieu chimique contenant du soufre, du phosphore, du potassium, du magnésium et du fer, constate que la culture est impossible en l'absence de phosphore et de potassium, (celui-ci ne peut pas être remplacé par du sodium, du lithium et du calcium, mais on peut lui substituer en partie du rubidium).

Récemment (1922) *A. Borrel, de Coulon, Bœz* et *Guimaud* ont composé un milieu renfermant également comme celui de *Frouin*, de la Glycérine et du Glucose mais riche en substances minérales. Après 20 jours ils ont obtenu une culture moyenne de 0,5 gr. à 1 gr. sur 140 cm^3 de liquide dans les boîtes de *Roux*.

Lobstein (1922) a composé un milieu chimique très simple et suffisant pour donner une culture abondante.

C'est le milieu préférable pour les chercheurs qui veulent étudier les modifications chimiques qui se passent dans la composition des microorganismes en fonction des variations du milieu nutritif.

Tels sont les principaux milieux chimiquement définis pour le développement de microorganismes, mais à notre avis il n'en existe pas de meilleur que celui établi par *Raulin* pour le Sterigmatocystis quand on n'a en vue que la richesse de la récolte.

RECHERCHES PERSONNELLES

I

Composition du milieu

Les recherches que j'ai entreprises pour choisir un milieu favorable pour obtenir une culture suffisante, sans

me préoccuper d'un rendement maximum, m'ont amené à cette conclusion que le milieu de *M. Lobstein* est le meilleur pour la culture du Grassbacillus II.

Ce milieu relativement simple est constitué par: du *phosphore*, du *soufre*, du *potassium*, par de *l'acide citrique*, du *magnésium*, de la *glycérine* et de *l'asparagine* dans les proportions suivantes:

Phosphate monopotassique	1,50	gr.
Sulfate de magnésium	1	»
Acide citrique	1	»
Asparagine	10	»
Glycérine neutre (D=1,26)	40	»
Eau distillée q. s. .....—1000	cm^3	»

L'acide citrique est ajouté, comme le dit Lobstein pour empêcher la précipitation du phosphate trimagnésique.

Je me suis servi pour la préparation de ce milieu de corps chimiquement purs.

Le liquide nutritif était réparti dans des ballons de 500 cm^3 à raison de 50 cm^3 liquide nutritif par ballon. Il était stérilisé à l'autoclave à 120° pendant vingt minutes.

Après stérilisation, le liquide a été ensemencé avec une parcelle de voile d'une culture âgée de 8 à 10 jours, provenant d'une culture de *Grassbacillus race Sartory*, adaptée à ce milieu.

Les ballons ensemencés ont été placés à l'étuve à 36°-37°.

Le développement de la culture a été rapide et abondant: au troisième jour la couche bacillaire couvre la surface du liquide et grimpe légèrement sur les parois du ballon; au 8-9e jours le voile est épais, gaufré et au 20e jour, la récolte moyenne par ballon (moyenne de 3 ballons) a été de 0,42 gr. de bacille sec. Si on diminue l'acidité du milieu par de l'hydrate de soude au lieu d'hy-

drate de potasse et en quantité suffisante pour avoir une acidité de 15 p. ‰, on constate que la récolte est légèrement diminuée.

II

Influence de la réaction du milieu.

La réaction du milieu est acide. L'acidité calculée en présence de phénolphtaleine, comme indicateur, jusqu'à coloration rose-pâle=32 cm.^{3} de liqueur normale de potasse. La concentration en ions H calculée par la méthode électrométrique, avec l'appareil *Vlés-Velinger* est égale à Ph=6,6.

Cette détermination est plus précise, parce que la présence des corps dits «tampons» (asparagine et phosphate) s'oppose à des brusques changements d'acidité ou d'alcalinité, et, par suite à un brusque changement de teinte de l'indicateur.

Le Comité de «L'American Public Health Association» en 1898, indique de neutraliser en présence de phénol-phtaleine le bouillon de viande (glycérine peptonée) et recommande d'ajouter ensuite 15 cm^3 d'hydrate de soude, ou plus exactement d'ajouter une quantité de soude telle qu'après stérilisation, il soit nécessaire d'employer 15 cm^3 d'acide chlorhydrique normal pour neutraliser 1 litre de liquide nutritif.

Nicolle conseille d'ajouter de la soude jusqu'au virage de phénol-phtaleine plus 10 cm^3 hydrate de soude pour ‰.

On a reconnu que les milieux synthétiques donnent de bons résultats lorsqu'ils sont acides.

Bezançon, Philibert et *Baudin* fixent l'acidité maxima à 0,70 p. ‰ exprimée en acide phosphorique (soit 14 cm^3 acide phosphorique normal).

Au contraire le milieu de *Baudran* est neutre et celui préconisé par *Delille, Mayer, Schæffer* et *Terroine* pos-

sède une alcalinité de 4 cm³ de soude normale par litre, de même que certains milieux de *Calmette, Massol* et *Breton.*

Donc la réaction optima pour les milieux synthétiques est variable avec la constitution du milieu.

Toutes mes recherches ont été faites avec le milieu de *Lobstein* dont nous avons indiqué plus haut la formule. J'ai expérimenté sur des milieux soit neutres, soit alcalins dont l'alcalinité était égale à 5, 15 et 30 cm³ de liqueur normale de potasse par litre, soit acides dont l'acidité était égale à 10, 15, 20 et 30 cm³ de liqueur normale par litre en présence de phénolphtaleine comme indicateur. Dans tous ces essais, j'ai utilisé la solution de potasse normale. L'ensemencement a été effectué le même jour, avec la même quantité du bacille adapté à ce milieu et âgé de 10 jours. Les résultats obtenus sont indiqués dans le *tableau I.* Des résultats inscrits dans ce tableau, on peut tirer la conclusion suivante: Le développement des bacilles est plus marqué sur les milieux acides et le développement maximum a lieu dans les solutions contenant de 15 à 17 cm³ de liqueur normale par litre. En présence d'un excès de potassium (sous la forme de potasse) il y a une diminution de récoltes.

Cette diminution est peut-être en fonction de l'hydrolyse de l'asparagine en présence de fortes alcalinités, ce qui a pour résultat de dégager de l'ammoniaque qui intoxique les bacilles; c'est l'opinion de *M. Lobstein.*

Sur le milieu alcalin on voit que, au fur et à mesure qu'on augmente l'alcalinité, la croissance des bacilles est en retard. Il est donc démontré que les deux limites d'acidité et d'alcalinité entre lesquelles le bacille peut se développer dépendent de plusieurs facteurs et surtout de la composition du milieu.

Tableau N° 1.

Réaction du milieu		Marche du développement (apparition du voile)	Aspect de la culture 22 jours après ensemencement.	Poids sec gr.
Milieu Alcalin	30 cm³ °/₀₀	Le développement ne commence que vers le 6e jour.	Pellicule mince couvrant presque toute la surface.	0,2151
	15 cm³ »	Le développement ne commence que vers le 4e jour.	Pellicule plus homogène couvrant toute la surface.	0,2305
	5 cm³ »	Au bout de 4 jours presque la totalité du liquide est couvert d'une couche des bacilles.	Pellicule peu gaufrée couvre la surface.	0,2565
Milieu neutre		Même résultat que pour la solution alcaline 5°/₀₀.	»	0,284
Milieu acide	10 cm³ °/₀₀	Au bout de 3 jours un voile couvre la surface.	Voile peu épaissi couvre la surface s'élevant le long de la parois.	0,360
	15 » »	Après 2 jours voile complet.	Voile épais, gaufré s'élevant le long des parois.	0,435
	20 » »	Au bout de 4 jours voile complet.	Aspect peu différent du précédent.	0,3822
	30 » »	Au bout de 5 jours pellicule fine couvre la surface.	Voile complet, mais plus souple.	0,5620

III

Valeur alimentaire comparative des diverses composés azotés

Le milieu demeurant le même, j'ai remplacé l'asparagine par quelques corps azotés organiques ou mineraux utilisés en quantités telles que leur teneur en azote est égale à la quantité d'azote contenue dans 10 grammes d'asparagine:

Ces quantités sont:

10,76 pour le citrate d'ammonium neutre
10,10 pour le succinate »
12,22 pour le tartrate »
8,76 pour le sulfate »
5,31 pour l'azotate »
13,42 pour l'azotate de potassium.

La teneur en azote de ces différentes quantités des substances est de 1 gr. 85, égale à celle contenue dans 10 gr. d'asparagine. Les résultats (moyenne de 3 ballons pour chaque d'eux) sont indiqués dans le *tableau II.*

On voit que les milieux où l'azote est d'origine organique favorisent le développement du bacille, tandis que l'azote minéral est un mauvais aliment azoté.

De plus si on pique des bacilles développés sur milieu où l'azote existe à l'état minéral sur des milieux contenant de l'asparagine, ces bacilles se développent mal et le développement s'arrête après quatre jours.

En même temps les cultures développées sur milieux qui contiennent l'azote minéral sont un peu moins abondantes que sur les milieux avec asparagine; ceci est dû à la présence du groupement aminé dans l'asparagine ainsi que l'ont observé: *Calmette, Massol* et *Breton* et plus tard *Lobstein* sur le bacille tuberculeux. *Besançon, Philibert* et *Baudin* disent que si on remplace l'asparagine par du succinate d'ammonium (4 p. ‰) on a de meilleures cultures. Contrairement à cette opinion, mes expériences ont démontré que 10,10 gr. de succinate d'ammonium peuvent donner des récoltes sensiblement égales à celles que donne l'asparagine. J'ai employé également l'acide aspartique et l'urée. A cause de la faible solubilité de l'acide aspartique (1:250 cm. eau à 15°) j'en ai dissous seulement 4 gr. p. ‰, ce qui représentent 0,42 gr. d'azote: le développement est assez rapide et la culture abondante. Vingt jours après l'ensemencement, j'ai ob-

Tableau N° 2.

Nature de l'aliment azoté	Marche du développement	Aspect de la culture 22 jours après l'ensemencement	Poids sec de la culture par ballon de 50 cm³ de liquide nutritif
Asparagine 10 °/₀₀	Au bout de 2 jours pellicule couvrant la surface du liquide et grimpant le long des parois du ballon	Voile épais, plissé, gaufré, de couleur jaune, couvre toute la surface et grimpant sur les parois du ballon	0,425 gr
Succinate d'ammonium 10,76 gr °/₀₀	Voile commence à se développer après 4 jours en grimpant sur les parois du ballon	Voile peu épais, plus plissé couvrant la surface du liquide et grimpant sur les parois du ballon	0,4140 „
Citrate d'ammonium 10,76 °/₀	Développement plus tardif, le voile couvre la surface après 6 jours	Même aspect, peu plissé et grimpant légèrement sur les parois du ballon	0,405 „
Tartrate d'ammonium 12,22 gr °/₀₀	Développement peu différent de celui du milieu avec le citrate	Voile peu plissé transparent, couleur jaune	0,359 „
Sulfate d'ammonium	Développement tardif et très lent	Pellicule très légère couvrant à peine toute la surface du liquide	0,1872 „
Azotate d'ammonium	»	Légère pellicule couvre ⅔ de la surface	0,108 „
Azotate de potassium	Développement très tardif et très lent	Légère pellicule presque insignifiante	0,0954 „

tenu une récolte moyenne de 0.435 gr. par ballon (en bacilles secs). Donc 0.42 gr. d'azote apportés par l'acide aspartique produisent la même récolte que 1.86 gr. d'azote apporté par l'asparagine. Pour comparer la puissance d'utilisation de ces deux corps azotés, comme dit *Lobstein*, j'ai diminué la quantité d'asparagine de 10 gr. à 5 gr. et 2,5 gr. p. ‰ (2,5 gr. asparagine renferment 0,42 gr. azote).

Après 22 jours, le milieu contenant 5 p. ‰ d'asparagine donne une récolte moyenne de 0.405 gr. bacilles

secs — tandis que celui obtenu avec 2,5 p. ‰ d'asparagine, tombe à 0.2655 gr. de bacilles secs. Cette diminution s'explique par la quantité d'azote contenue dans le groupement carboxyl — aminé qui dans le 2,5 gr. asparagine renferme 0.42 gr. d'azote. *Delille, Mayer, Schæffer* et *Terroine* ont employé pour la nutrition du bacille tuberculeux un acide aminé (glycocolle) (4 gr. p. ‰=0.7 d'azote) et un acide diaminé, l'asparagine (2 gr. p. ‰=0.34 d'azote) ils ont obtenu rapidement une culture abondante après huit jours, tandis que, avec le bouillon peptoné, il a fallu 20 jours pour obtenir la même récolte. D'autre part, on sait que l'addition d'arginine et d'histridine accélère la végétation.

Ils ont fait les mêmes constatations en ce qui concerne les principes extractifs du bouillon: carnosite et créatine. Donc l'arginine de même que l'histidine accélèrent la végétation.

Plus tard, *Mauthuer,* puis *Baumann* et *Thornsten-Ingwaldsen* étudiant la constitution de la carnosite concluent que l'action favorisante résulte de la présence de la β. Alanilhistidine.

L'action favorisante de l'arginine est expliquée par *Lambling;* il admet que par désamination, l'arginine donne de l'acide guanidino-butyrique, lequel oxydé en β donne de l'acide guanidino-acétique qui peut se methyler dans l'organisme du lapin pour donner la créatine. Le noyau de guanidine ainsi que le noyau imidazolique de l'histidine joue un rôle important dans le métabolisme des animaux supérieurs qui exige au moins un de ces noyaux.

Remplaçant l'asparagine par l'urée (4 gr. p. ‰) j'ai obtenu une récolte moyenne égale à 0.369 gr. après vingt jours.

Valeur nutritive comparative de diverses hydrates de Carbone.

L. Vaillant 1906 remplace dans le bouillon-glycériné pour le bacille tuberculeux, la glycérine par diverses sucres (glucose, lévulose, saccharose, lactose) ; avec la glucose, il a obtenu un rendement supérieur à celui obtenu par culture sur bouillon glycériné. Sur des milieux chimiquement définis ce remplacement de la glycérine par les sucres a donné des résultats ou nuls ou médiocres. *Delille, Mayer, Schæffer* et *Terroine* ont remplacé la glycérine par diverses sucres, le résultat a été négatif.

La glycérine se trouve dans toutes les formules de milieux à l'exception de celui de *Baudran* où elle est remplacée par des glycérophosphates. Dans le milieu initial dont la formule a été déjà indiquée, la quantité d'acide citrique étant élevée à 2 gr., j'ai remplacé la glycérine par divers corps hydrocarbonés: alcools polyatomiques, sucre réducteurs non hydolysables et enfin sucre hydrolysables. L'ensemencement fut fait avec des bacilles adaptés au milieu avec glucose et dans des ballons de 250 cm^3 (chacun contenant 50 cm^3 liquide).

Alcools polyvalents.

J'ai remplacé la glycérine par une quantité de ces corps (érythrite et mannite) qui apportent la même quantité de Carbone.

Erythrite: les bacilles se développent assez bien couvrant la surface au bout de 5 jours et, après 22 jours, on obtient une couche appréciable de bacilles gaufrés, le poids moyen de la récolte a été de=0,2745 gr. pour 50^{cc} de liquide nutritif.

Mannite: les bacilles présentent le même développement; mais la couche bacillaire n'est pas gaufrée. Le poids moyen de la culture est: = 0,310 gr.

Hexoses

Glucose. La glycérine est remplacée par un poids égale de glucose anhydre soit 40 gr. qui apportent sensi-

blement la même quantité de carbone. J'ai expérimenté en milieu acide (acidité 15 cm³ de liqueur normale par litre), en milieu neutre, et en milieu alcalin (alcalinité 5 cm³) de liqueur normale.

Après 3 jours, un voile épais assez mamelonné couvre toute la surface du liquide et grimpe le long des parois des ballons plus haut que sur le milieu glycérine. Après 20 jours, le voile est d'une couleur jaunâtre, gaufré, très épais et plonge en partie dans le liquide. Après 22 jours, il commence à se sectionner et à 25 jours, il tombe en totalité au fond et une deuxième couche se forme de nouveau à la surface.

La récolte moyenne de trois ballons sur les milieux acides, a été égale à 0.350 gr. de bacilles secs pour 50 cm³ de liquide nutritif. Sur les milieux neutres il a été de 0.3355 gr. et sur les milieux alcalins de 0.3293. On voit bien que le Grassbacillus II se développe moins favorablement sur les milieux contenant de la glucose.

Lobstein a obtenu sur le même milieu, pour le bacille tuberculeux, une récolte supérieure à celle obtenue avec de la glycérine, la récolte a oscillé entre 0.470 à 600 milligr. par ballon de 50 cm³ liquide nutritif.

Sur le milieu acide la culture fut plus abondante, contrairement à *Lobstein* qui a effectué des ensemencements avec des bacilles tuberculeux cultivés sur bouillon peptoné glycériné, le grassbacillus ne pousse pas s'il est cultivé sur un milieu glycériné, ou s'il pousse, il pousse rare et assez mal. (Le développement s'arrête après 4 - 5 jours.) Il en est de même quand on fait un ensemencement avec une portion de bacilles cultivés sur un milieu glycérino-glucose à parties égales; au commencement le bacille pousse et puis le développement s'arrête. Pour cette raison, j'ai été obligé de pratiquer une véritable adaptation au milieu en faisant passer les bacilles d'un milieu glycériné à un milieu glycérino-glucose et ensuite à un milieu glucosé. Les cultures faites sur milieu glucosé

dégagent la même odeur aromatique mais plus marquée que dans les cultures faites sur les milieux glycérinés. Alors que pour le bacille tuberculeux, ainsi que l'a constaté *Lobstein*, il est nécessaire de porter la quantité d'acide citrique de 1 gr. à 2 gr. pour faciliter l'attaque de la glucose, pour le grassbacillus cette adddition d'acide citrique est contre indiquée parce que la quantité de potasse normale ajoutée, pour avoir une acidité de 15‰ retarde et arrête ensuite le développement des bacilles.

Glycérine et glucose. Remplaçant la moitié de la glycérine par du glucose on obtient des cultures inférieures à celles obtenues sur des milieux de glycérine et supérieures à celles provenant de milieux glucosés. L'aspect de la culture est peu différent des cultures faites sur milieux glucosés. L'odeur de la culture est plus prononcée que pour les milieux glycérinés. Après 3 jours la couche bacillaire est déjà gaufrée. La récolte moyenne obtenue par ballon de 50 cm³ de liquide nutritif est: 0.3635 gr. de bacilles secs.

Fructose

Le remplacement de la glycérine par le fructose a donné des mauvais résultats; en effet, au bout de vingt jours, la récolte n'a été que de 0.155 gr. par ballon de 50 cm³ liquide nutritif.

Hexobioses

Saccharose. Dans les milieux où la glycérine a été remplacée par du saccharose (10 p. ‰) le développement du bacille est un peu plus abondant que dans le cas du fructose.

En tenant compte des observations de *Lobstein*, j'ai ajouté la saccharose après stérilisation et j'ai obtenu une récolte moyenne de 0.2115 gr. par ballon de 50 cm³ liquide nutritif.

Lactose. Avec le lactose et dans les mêmes conditions expérimentales, j'ai obtenu après 20 jours de culture un faible rendement: il est égal à 0.1025.

Polysaccharides

Amidon. J'ai expérimenté aussi avec l'amidon et la dextrine. Sur milieu neutre contenant 20 gr. p. ‰ d'amidon, j'ai constaté que le développement du bacille est très lent et après 20 jours je n'ai obtenu qu'un rendement moyen de 0.095 gr. bacilles par ballon contenant 50 cm^3 liquide nutritif.

Avec la *Dextrine,* les résultats sont encore moins favorables et on peut dire que la culture ne se développe pas. Donc la Dextrine ne se montre pas comme un aliment avantageux pour le grassbacillus.

CHAPITRE II.

Variations de la teneur du Grassbacillus II[e] en Azote au cours de son développement
Recherches personnelles

Si la constitution du bacille tuberculeux est loin d'être définitivement établie comme dit *Lobstein*, la constitution chimique du Grassbacillus II est presque inconnue. Je me suis proposé d'étudier les variations intéressantes que les composants du bacille peuvent subir dans certaines conditions biologiques: au cours du développement microbien et surtout en faisant varier la constitution du milieu nutritif.

J'indiquerai chaque fois les techniques des dosages que j'ai employés et les remarques faites au cours de ces dosages.

Mes recherches furent faites sur des bacilles vivantes.

Variations des proportions d'eau et d'azote dans le bacille Grass II[e] au cours de son développement.

Technique des dosages

Eau: Pour la détermination du poids sec comme pour la détermination de l'humidité, j'ai employé la méthode suivante:

Le contenu des ballons de culture est versé dans un becher où les bacilles sont homogénéisés et lavés avec de l'eau distillée. Après trois ou quatre lavages, les bacilles sont transportés sur un filtre formé de deux papiers filtre sans cendres et en particulier sans phosphore, ni azote.

Pour accélérer le filtrage, je me suis servi de trompe. Après lavage complet, les deux papiers filtre sont enlevés et placés entre des papiers de filtre ordinaire jusqu'à ce que les premiers restent secs.

Les bacilles contenus dans le papier filtre sont pesés et puis mis à l'étuve pendant une heure, à une température de 105° et de nouvau pesés. Les dosages ont été opérés chaque fois, sur le contenu de deux ballons. Le calcul donne le pourcentage de l'humidité. C'est la méthode de Lobstein mais j'ai remplacé le coton serré par des papiers filtre, pour avoir la totalité de bacilles.

Azote total

Le dosage de l'azote total a été fait par la méthode de Kjeldahl et avec l'appareil de Parnas et Wagner.

Les composés azotés du bacille furent détruits par l'acide sulfurique concentré en présence de S O^4 Cu. (trace) comme réducteur. jusqu'à décoloration complète.

Dans ces conditions la totalité de l'azote est transformée en ammoniaque.

Le poids de la prise d'essai a varié de 0,2 gr. jusqu'à 0,85 gr. Le titrage de l'ammoniaque a été effectué avec une solution d'acide sulfurique décinormal et de potasse décinormale en présence de méthylorange. Les bacilles se sont développés sur le milieu chimique indiqué dans le premier chapitre. Le liquide nutritif était réparti dans des ballons de 500 cm^3 à raison de 50 cm^3 par ballon et ensemencé avec une partie égale d'une culture sur le même milieu âgée de 10 jours. Acidité du milieu=15 cm^3 n/1 PH=6.6.

Les premiers dosages ont été faits 10 jours après l'encemencement, ils ont été continués de 5 à 5 jours jusqu'à 51 jours.

Le *tableau n°* 3 indique les résultats obtenus.

Ils ont été établis en prenant la moyenne de dosages effectués sur le contenu de quatre ballons, et chaque dosage a été l'objet de deux déterminations.

Tableau N° 3.

Age de la culture en jours	Nature de l'aliment azoté	Récolte moyenne par ballon de 50 cm³ en bacilles secs gr.	Teneur en eau pour 100 gr. de bacilles frais gr.	Teneur en azote pour 100 gr. de bacilles secs gr.
10	Asparagine	0,200	73,61	8,980
15	10 °/₀₀	0,240	75,75	8,500
20	Ph. I 6,6	0,4350	80,06	8,314
25	»	0,3550	81,02	8,191
30	»	0,3235	81,87	8,255
35	»	0,2580	82,05	7,860
40	»	0,2590	82,51	7,104
44	»	0,2442	83,30	7,200
51	»	0,2530	85,46	7,214

La culture s'est développée jusqu'au 22e jour, puis après 25 jours le voile microbien s'est immergé partiellement. Entre 30 et 35 jours, il s'est formé une couche mince qui s'immerge aussi vers le 45e jour. Entre le 48e et le 51e jour, est apparu une troisième couche mince mais discontinue. Quand la culture s'immerge. il y a autolyse accompagnée d'une diminution du poids de la culture. Ces mêmes constatations ont été faites sur le *Stérigmatocystis nigra* et sur le Bacille Tuberculeux.

L'examen du tableau permet de conclure: d'une part, il y a avec l'âge, au cours du développement, augmentation de la teneur en eau, d'autre part diminution de la teneur en azote. La teneur en eau passe par un maximum, la teneur en azote passe par un minimum. La décroissance de la proportion centesimale d'azote avec le développement fut observée par *G. André* dans les plantes vertes notamment sur le blé (plante totale). En Mai, il trouve 4,6 gr. d'azote p.% de matière sèche, tandis que, en Juillet, il trouve seulement 1,4 gr. *Terroine Wurmser* et *Montané* ont constaté aussi une décroissance au cours du développement du *Sterimotocystis*

nigra. Le taux d'azote est de 6,6 dans les récoltes inférieures à 0,1 gr. et 5,3 quand le poids de récolte est compris entre 1 gr. et 1,5 gr. Ce phénomène paraît donc général, qu'il s'agisse de plantes à chlorophile, de moisissures ou de bactéries.

2.

Variations de la teneur du Bacille Grass II[e] *en azote* avec la nature et la concentration de l'aliment azoté.

J'ai fait varier la nature ou la quantité de l'azote alimentaire, le milieu par ailleurs demeurant le même (la glycérine en tout cas reste l'aliment ternaire), dans le but de voir si ce changement peut déterminer aussi des variations dans la teneur en azote du bacille.

Comme sources d'azote j'ai employé: l'*asparagine*, l'*acide aspartique*, l'*urée*, puis le *Succinate d'ammonium*, le *Citrate d'ammonium*, *le tartrate d'ammonium* et le *sulfate d'ammonium*.

L'asparagine fut employée aux concentrations de 10 gr., 5 gr. et 2,25 gr. par litre. Le *tableau n*° 4 rend

Tableau N° 4.

Age de la culture en jours	Nature de l'aliment azoté	Poids sec moyen par ballon de 50 cm³ de liquide gr.	Teneur en azote pour 100 gr. de bacilles secs
20	Asparagine 5 ‰	0,4058	8,300
»	» 2,5 ‰	0,2505	6,147
»	Urée 4 ‰	0,3690	8,114
22	Succinate d'ammonium 10,76 gr. ‰	0,4144	6,746
»	Tartrate d'ammonium 12,22 gr. ‰	0,3591	6,720
»	Citrate d'ammonium 10,76 gr. ‰	0,4090	6,7318
»	Sulfate d'ammonium 8,76 gr. ‰	0,1072	6,318
»	Acide aspartique. 4 gr. ‰	0,356	4,090

compte de l'expérience et des résultats obtenus. La technique du dosage est restée la même que précédemment. Malgré les différences des poids des récoltes, on peut voir que les bacilles avaient dans tous les cas une alimentation suffisante permettant leur développement, même dans les milieux les plus pauvres en azote, c'est-à-dire contenant 5 gr. d'asparagine; la totalité de l'azote n'a pas été utilisée.

On voit que si l'asparigine est remplacée par de l'urée (avec même apport d'azote), la teneur des bacilles en azote n'est presque pas modifiée. Au contraire si on remplace l'asparagine par de l'acide aspartique on voit un abaissement assez sensible de la teneur des bacilles en azote.

Lobstein en 1922 a observé le même fait sur le bacille tuberculeux. En remplaçant l'asparagine par le Succinate d'ammonium (avec même apport d'azote) on constate une diminution du taux d'azote. Avec le Citrate d'ammonium, le Tartrate d'ammonium, le Sulfate d'ammonium et l'azotate d'ammonium: même observation.

Avec le *sterigmatocystis, Terroine, Wurmser* et *Montané* ont vu une influence nette dûe à la nature de l'aliment azoté.

En substituant l'urée, ou du nitrate d'ammonium ou du sulfate d'ammonium, ils voient une légère diminution de l'azote de 6 à 5,57 et 5,2 tandis que la guanidine produit une diminution sensible (3,3 gr. d'azote % bacille secs).

2.

Variations de la teneur du bacille en azote avec la réaction du milieu.

Si on fait varier l'acidité ou l'alcalinité du milieu initial et que le taux de l'azote alimentaire reste constante, ces variations peuvent provoquer aussi des variations dans la teneur en azote. Le *tableau n°* 5 réunit les don-

Tableau N° 5.

Age de la culture en jours	Nature de l'aliment azoté et réaction du milieu		Poids moyen en bacilles secs par ballon de 50 cm³ de liquide nutritif gr.	Teneur en azote pour 100 gr. de bacilles secs gr.
22	Asparagine 10°/₀₀ Alcalinité 15°/₀₀	30°/₀₀	0,2305	6,994
»		15 °/₀₀	0,2840	7,746
»		5 °/₀₀	0,2545	7,750
»	Neutre =		0,2251	7,810
»	Acidité	10 °/₀₀	0,3600	7,833
»		15 °/₀₀	0,4320	8,140
»		20 °/₀₀	0,3822	7,955
»		30°/₀₀	0,3620	7,928

nées de l'expérience et les résultats obtenus. De l'inspection de ce tableau, on peut conclure qu'il y a une diminution de taux d'azote avec l'augmentation de l'alcalinité, tandis que en augmentant l'acidité on a au début augmentation (acidité 15%) et après il y a aussi une diminution.

II

Variations de la teneur du Grassbacillus II^e en matières albuminoïdes avec la nature de l'aliment ternaire.

Technique: Le dosage des matières albuminoïdes a été fait selon la méthode de *Voit* qui se résume ainsi qu'il suit:

On prend 2 gr. de bacilles frais cultivés sur le milieu initial, matière azotée: Asparagine 10%, on fait un broyage avec du sable de verre, puis on passe le tout dans une fiole jaugée de 250 cm³, on ajoute 40 cm³ d'eau distillée, 4-5 gouttes d'une solution de tropéoline 0,0. Ensuite on ajoute de l'acide de chlorhydrique concentrée goutte à goutte jusqu'à coloration rouge, puis 190 cm³ d'alcool à 90°. On laisse reposer 6 heures et après on ajoute 5 cm³ d'une solotion de sulfate de soude à

200 gr. ‰. On remplit le ballon avec de l'alcool à 96° et on laisse reposer encore une heuse, en agitant de temps en temps.

L'alcool en milieu acide précipite toutes les matières albuminoïdes. On filtre et on prélève 50 cm^3 du liquide dans un ballon Kjedahl de 100 cm^3. Après évaporation dans le vide de l'alcool, on fait la destruction de la matière organique et le dosage de l'azote soluble selon la méthode de Kjeldahl et dans l'appareil de Parnas-Wagner. On a ainsi l'azote non protéique.

D'autre part, sur un autre échantillon, on fait le dosage de l'eau suivi d'un dosage d'azote total.

Le calcul des matières albuminoïdes se fait d'après la formule suivante:

Azote totale — Azote soluble = Azote albuminoïde.

Azote albuminoïde × 6,25 = *Matières albuminoïdes.*

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant n° 6:

Tableau N° 6.

Age de la culture en jours	Nature de l'aliment ternaire	Azote totale % gr.	Azote soluble % gr.	Azote albuminoïde	Teneur en matières albuminoïdes pour 100 gr. de bacilles secs gr.
20	Glycérine	8,320	1,4018	6,919	42,334
»	Glycérine et Glucose	9,345	1,728	7,617	47,616
»	Glucose	11,614	2,084	9,530	59,562
40	Glycérine	7,180	1,826	5,354	33,462
»	Glycérine et Glucose	8,524	2,180	6,344	39,650
»	Glucose	10,246	2,450	7,796	48,725

Ce tableau montre que le taux des matières albuminoïdes au cours du développement passe par un maximum et, d'autre part, que le bacille soumis à une

inanition partielle continue à vivre aux dépens de sa matière albuminoïde propre. Il montre encore nettement que les bacilles cultivés sur des milieux glycérinés et glucosés et surtout sur le milieu glucosé possédent une teneur en matières albuminoïdes plus élevée que les bacilles cultivés sur le milieu glycériné.

Il est probable qu'il y a formation dans ces milieux d'aspartate d'ammonium et la présence de ce sel nous a créé beaucoup de difficultés au cours de nos expériences, pour le dosage de l'azote soluble, fait qui nous a empêché de suivre complètement la formation et la dépense des matières albuminoïdes au cours du développement, desideratum qui a exprimé Lobstein dans une de ses publications.

Nous comptons pouvoir procéder ultérieurement à cette recherche.

III.

Variations suivant la nature de l'aliment ternaires de la teneur du Grassbacillus II[e] *en phosphore total*

c'est-à-dire: phosphore lipoïdique, phosphore nucléinique, phosphore organique soluble et phosphore mi néral soluble et insoluble.

Je vais d'abord décrire la méthode publiée par Machebœuf et j'indiquerai ensuite les modifications qu'il m'a paru intéressant et utile d'y apporter.

Méthode de Machebœuf: Elle comporte 5 opérations principales:

1) *Destruction sulfonitrique des matières organiques du sang:* Dans un tube à essai mesurant environ 20 cm. de long et 2 cm. de large, on ajoute 1 c.c. de sang puis 1 c.c. d'acide sulfurique concentré pur, on porte à une légère ébullition en chauffant pendant une dizaine de minutes, on laisse refroidir et on ajoute 1 cm^3 d'acide nitrique fumant, on porte de nouveau à l'ébullition.

Après la disparition des vapeurs nitreuses et apparition d'une couleur brune on ajoute de nouveau quelques gouttes d'acide nitrique fumant et on continue à chauffer; la destruction est achevée, lorsque le mélange réactionnel est complètement décoloré ou ne possède qu'une faible teinte jaune.

2) *Précipitation du phosphomolybdate d'ammoniaque.*

On laisse refroidir le liquide obtenu, puis on l'étend avec 6 cm^3 d'eau distillée, on ajoute 2 cm^3 d'une solution saturée d'azotate d'ammonium et on porte le tube dans un bain-marie bouillant. Après une dizaine de minutes, on introduit dans le tube à essai 6 cm^3 d'une solution à 5 p. % molybdate d'ammonium, on agite, et on laisse encore 10 minutes dans le bain-marie.

Le précipité formé est rassemblé au fond du tube, une partie cependant surnage et grimpe le long des parois, on laisse refroidir, puis on ajoute 5 cm^3 d'alcool à 95° qui rassemble dans le liquide le précipité déposé sur le paroi, on décante rapidement. Dans mes expériences, j'ai employé ce mode opératoire avec une légère modification consistant à supprimer l'emploi de l'alcool à 95°. J'ai remarqué, en effet, que par l'addition d'alcool le précipité est légèrement coloré en bleu et que le dosage du phosphore dans ce précipité donne un chiffre supérieur de 2 à 3 p. % à celui du phosphore contenu dans un précipité recueilli sans addition d'alcool.

3) *Filtration.*

Machebœuf s'était servi de l'appareil de *Pregel* voir fig. 1. En A est un filtre d'amiante fin tassé sur coton de verre, B est en relation avec une trompe à l'eau.

Le tube T doit descendre seulemnt à 1 cm. du fond du tube à essai E.

On fait l'aspiration du liquide surnageant en ayant soin d'entraîner le moins possible de précipité. On rince ensuite avec 5 cm^3 d'alcool à 50° et on décante de la

même façon. On opère ainsi 5 lavages avec de l'alcool à 50° en rinçant les parois du tube et laissant déposer le précipité, avant de relier à la trompe à l'eau. Finalement le bouchon C est enlevé et avec quelques gouttes d'alcool à 50° on lave l'extrémité du tube T et l'intérieur de l'entonnoir A.

Le lavage ainsi terminé, le précipité de phosphomolybdate d'ammonium est en majeure partie resté au fond du tube à essai, une partie cependant est en A sur l'amiante.

4) *Dissolution du précipité.*

Le bouchon est enlevé de la fiole conique que l'on vide et rince avec de l'eau distillée, ainsi que l'extrémité F de l'entonnoir A. L'appareil étant remonté, on verse dans le tube E quelques cm^3 d'ammoniaque diluée de 4 volumes d'eau distillé et l'on remet l'appareil en communication avec la trompe à eau ouverte très modérément afin que le passage de l'ammoniaque soit lent. Cet ammoniaque dissout le précipité et la solution obtenus est recueillie dans la fiole conique. On rince 2 ou 3 fois le tube à essai et le filtre.

J'ai modifié l'appareil de Pregel comme le montre la figure 2.

Je remplace le filtre d'amiante à courte tige par un filtre d'amiante A' modèle *G. Bertrand* N° 4 à longue tige qui, passant par la boule B' pénètre dans une fiole en pyrex de 250 cm^3.

La boule B' à l'aide d'un bouchon en caoutchouc est mis en communication avec la fiole en pyrex de 250 cm^3.

La marche de l'opération reste la même, mais celle-ci est simplifiée parce qu'après le lavage complet du précipité du phosphomolybdate d'ammonium par l'alcool, on lave l'extrémité de la tige, on remplace la fiole par une autre propre. On continue l'opération par la dis-

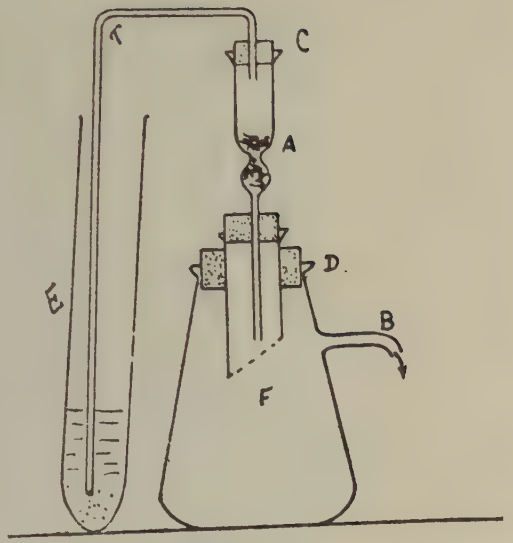

Fig. N⁰ 1

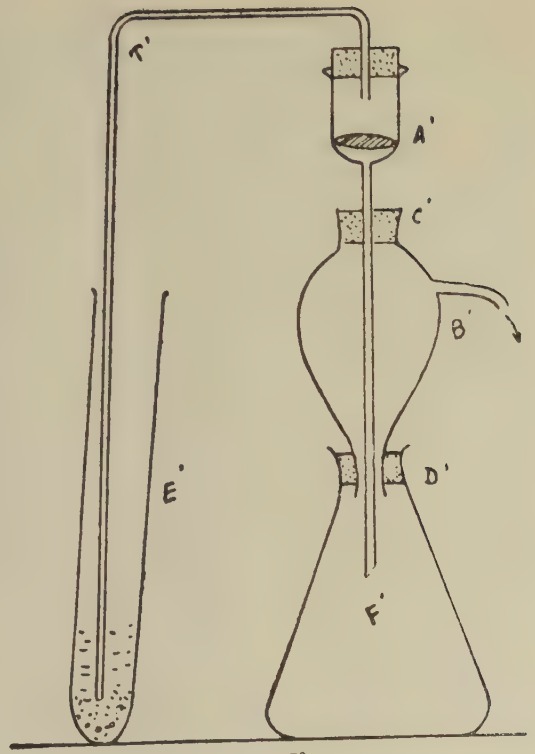

Fig. N⁰ 2

solution du précipité et enfin on passe au titrage du phosphomolybdate.

5) *Titrage du phosphomolybdate.*

La solution contenue dans la fiole conique est introduit dans un ballon genre Kyeldahl de 200 cm^3. On ajoute 10 cm^3 d'une solution 1/25 de soude et une petite cloche capillaire, puis on porte à l'ébullition dans le vide.

L'ammoniaque libre ainsi que l'ammoniaque fixée à l'acide phosphomolybdique et que déplace la soude est éliminée par la chaleur après une quinzaine des minutes, ainsi qu'on peut le contrôler au moyen d'un papier de tournesol rose humide placé dans les vapeurs sortant du col du ballon.

On ajoute 10 cm^3 d'une solution d'acide sulfurique 1/25, on porte de nouveau à l'ébullition pendant 2 minutes, puis on fait le titrage de l'excès d'acide sulfurique par la soude à chaud et en présence de phénolphtaleine.

La couleur rose obtenue par la neutralisation de l'acide doit persister cinq minutes; s'il n'en est pas ainsi, on ajoute au liquide pour y réussir une goutte de la soude 1/25.

Le nombre des cm^3 de soude versés multipliés par 0.0448 donne en milligrammes le poids de phosphore contenu dans la prise d'essai.

Ici j'ai simplifié complètement le dispositif employé par Machebœuf, ce qui m'a permis d'éviter de faire des transvasements, cause possible de pertes pendant cette opération.

Dans la solution phosphomolybdique ammoniacale contenue dans le récipient, on ajoute quelques gouttes de phénolphtaleine, on porte à l'ébullition 10 minutes, l'ammoniaque libre est éliminée et on a une faible coloration rose, on ajoute 10 cm^3 de soude 1/25 on porte à l'ébulition 10 minutes pour chasser l'ammoniaque com-

binée puis on ajoute 10 cm³ d'acide sulfurique 1/25 et on titre à chaud l'excès de cet acide par la soude 1/25.

C'est un fait bien connu en physicochimie que les bases fortes telles que (Na. OH) sont capables de déplacer les bases faibles (NH4OH) ; donc il n'y a nul besoin d'utiliser le *modus operandi* de Machebœuf.

En résumé *la méthode envisagée* par nous peut se résumer ainsi qu'il suit:

1) *Destruction sulfo-nitrique des matières organiques du Grassbacillus II*[e]. Dans une fiole Kjeldahl de 25 cm³ on introduit 0.2 grammes de bacilles frais 2-3 cm³ d'acide sulfurique concentré, on porte à l'ébullition en chauffant légèrement pendant 10 minutes, on laisse refroidir et on ajoute 1-2 cm³ d'acide azotique fumant, on porte de nouveau à l'ébullition. Après la disparition des vapeurs nitreuses et apparition d'une couleur brune, on ajoute de nouveau quelques gouttes d'acide nitrique fumant.

La destruction est terminée lorsque la décoloration est complète ou bien lorsque le mélange n'a plus qu'une coloration faible jaune pâle.

2) *Précipitation du phosphomolybdate d'ammonium.*

On laisse refroidir le liquide ainsi obtenu puis on l'étend avec 6 à 8 cm³ d'eau distillé, on ajoute 2 à 3 cm³ d'une solution saturée de nitrate d'ammonium et on porte la fiole dans un bain-marie bouillant. Après 15 minutes, on introduit dans la fiole 6 à 8 cm³ d'une solution à 5% molybdate d'ammonium, on agite et on laisse séjourner 10 minutes dans le bain-marie.

Le précipité formé se rassemble au fond de la fiole, une partie surnage et grimpe le long des parois. On laisse refroidir, puis on abandonne quelques minutes pour que le précipité se rassemble au fond et on procède à la filtration.

3) *Filtration.*

L'appareil de filtration modifié par nous comme il est indiqué dans la figure n° 2 est relié à une trompe à eau, on fait fonctionner celle-ci par l'intermédiaire du tube C en faisant descendre progressivement le tube T vers le fond de la fiole E, en ayant soin d'entraîner le moins possible de précipité.

On lave ensuite la fiole avec 5 cm^3 d'alcool à 50° on laisse se déposer le précipité, on décante et on filtre.

On fait ainsi 5 lavages avec l'alcool à 50° en rinçant chaque fois les parois de la fiole et laissant se déposer le précipité avant de faire fonctionner la trompe à l'eau. Finalement on enlève le bouchon C et à l'aide d'une pissette on lave avec de l'alcool à 50° l'extrémité du Tube T et les parois intérieures de l'entonnoir du filtre d'amiante.

4) *Dissolution du précipité.*

On enlève le bouchon D, on le lave ainsi que la tige du filtre par l'alcool à 50°, puis on remplace la première fiole en pyrex (250 cm^3) par une autre propre.

On dissout le précipité dans la fiole E par quelques cm^3 d'ammoniaque diluée de 4 volumes d'eau, on remet l'appareil en communication avec la trompe à eau ouverte très modérément, pour que le passage de la solution ammoniacale soit lent. Le précipité étant dissous on lave avec soin 2 à 3 fois la fiole E avec de la solution d'ammoniaque au 1/4 en faisant passer chaque fois le liquide dans la fiole en pyrex. On lave aussi 2 fois le bouchon C et le filtre d'amiante avec la solution d'ammoniaque, puis on lave 2 à 3 fois à l'eau distillée: la fiole E, le bouchon C, le filtre et la tige du filtre d'amiante.

5) *Titrage du phosphomolybdate d'ammonium.*

Dans la solution de phosphomolybdate d'ammonium contenue dans la fiole en pyrex, on ajoute 5 gouttes d'une solution alcoolique de phénolphtaleine à 1 %, on

porte à l'ébullition jusqu'à coloration rose faible, puis on ajoute 10 cm³ d'une solution de soude N/25 on porte de nouveau à l'ébullition pendant 10 minutes, on ajoute 10 cm³ d'une solution d'acide sulfurique N/25, on porte de nouveau à l'ébullition pendant 2 minutes, et on fait le titrage de l'acide sulfurique en excès par une solution de soude N/25 jusqu'à ce que la coloration rose obtenue persiste pendant 5 minutes. Le nombre de cm³ de soude versés correspond à la quantité de soude combinée à l'acide phosphomolybdique. En multipliant ce nombre par le facteur 0.0448 on obtient le poids de phosphore (exprimé en milligrammes) contenu dans la prise d'essai.

IV.

Méthode de dosage du phosphore, nucléinique, du phosphore lipoïdique, du phosphore organique soluble, du phosphore minéral soluble et du phosphore minéral insoluble.

Méthodes indiquées par Javillier et ses élèves.

Javillier et *H. Allaire* en 1925 indiquent une méthode générale pour le dosage de phosphore: *lipoïdique, organique soluble, nucléinique, minéral soluble* et *insoluble* sur la même prise d'essai elle se résume ainsi: La substance à l'état de poudre fine est introduite dans une fiole spéciale de 90 cm³ en verre *dépoli*, à large ouverture, renfermant des billes de verre, puis traitée par 75 cm³ d'un mélange d'alcool à 96° (2 parties), et d'éther (1 partie), on bouche le flacon et on le soumet à un mouvement continu autour de son axe à l'aide d'un dispositif approprié; grâce à ce mouvement et aux chocs multipliés des billes de verre, la poudre cède au solvant les lipoïdes et l'extraction est totale, si, après filtration, on répète la même opération.

A la fin, il reste un liquide renfermant tous les *lipoïdes* et une poudre qui contient le phosphore *nucléinique* et le phosphore *minéral soluble* et *insoluble*. Le

liquide éthero-alcoolique est distillé dans le vide, le résidu est déshydraté par de l'alcool absolu. Le résidu provenant de la distillation dans le vide de l'alcool absolu, est extrait par l'éther anhydre, et ensuite par de la benzine. Sur le résidu éther-benzénique, on effectue le dosage de phosphore lipoïdique. La poudre après séparation des lipoïdes est traitée par une solution de chlorure de sodium à 15 p. %, afin de dissoudre les substances nucléiniques et les phosphores minéraux solubles. Pour y réussir, la poudre est projetée dans 25 cm^3 d'une solution bouillante de Nacl à 15 p. % contenue dans un vase à précipitations chaudes et maintenue à l'ébullition 10 minutes.

On introduit ensuite la poudre et le liquide dans une fiole jaugée de 50 cm^3 et l'on complète à 50 cm^3 avec de la solution de chlorure de sodium à 15 p. %, on agite le mélange et on laisse en contact pendant 6 heures en agitant de temps en temps.

On prélève 25 cm^3 du filtrat dans un tube à centrifuger. Aux 25 cm^3 du filtrat, on ajoute lentement et en agitant 10 gouttes d'acide chlohydrique 1 p. 2. Il se forme un précipité contenant les substances nucléiniques et pour entraîner ce précipité au fond, on ajoute quelques gouttes d'une solution d'azotate d'argent à 5p. % qui, formant un précipité de chlorure d'argent augmente la masse du précipité et facilite la formation d'un dépôt au fond du tube par une centrifugation de 10 minutes.

Le précipité est dissous dans l'acide nitrique concentré; cette solution est versée en totalité dans un matras de Kjeldahl et soumise à la destruction nitrique. L'acide phosphorique obtenu est dosé d'après la méthode de *Copaux*.

La méthode préconisée par *Javillier* et *H. Allaire* permet-elle d'extraire la totalité des lipoïdes? On peut répondre par la négative. C'est la conclusion qui se dégage des critiques faites par *Lemeland* à la méthode de

Kumagawa-Suto et surtout des travaux effectués par *Terroine et ses élèves* et il est certain qu'aucun solvant organique ne peut enlever la totalité des lipoïdes donc de tout le phosphore lipoïdique et phosphore organique soluble. Ainsi les expériences faites par *Terroine* en utilisant la méthode de *Kumagawa-Suto*, sur le sang, ont permis en effet de constater que, dans ce cas le résidu d'extraction alcoolique renfermait encore après 8 heures d'épuisement 2,3 gr. p: % d'acides gras totaux.

II. En ce qui concerne le dosage de *phosphore nucléinique*, il n'est pas possible de recueillir la poudre qui se trouve attachée sur les parois du flacon dépoli et surtout sur les billes de verre qui se dépolissent pendant d'agitation électrique. Les essais que j'ai faits avec des ballons dépolis ne m'ont pas permis de recueillir toute la poudre qui se trouvait sur les parois du ballon.

En outre, après l'ébullition de la poudre avec la solution de chlorure de sodium à 15 gr. p. %, les auteurs font passer la poudre et le liquide dans un ballon jongé de 50 cm^3 puis après addition de la solution de chlorure de sodium jusqu'à 50 cm^3, ils filtrent après un repos de 6 heures et ils effectuent le dosage du phosphore nucléinique d'après la méthode indiquée ci-dessus et les chiffres obtenus multipliés par 2 donnent la quantité de phosphore nucléinique existant dans la prise d'essai. Cette méthode comporte une autre cause d'erreur. En effet, la poudre se gonfle en absorbant une partie de la solution et d'autre part la quantité de la solution de chlorure de sodium n'est pas égale à 50 cc^3, puisque la poudre occupe un certain volume diminuant d'autant le volume total des 50 cc. Donc les 25 cm^3 du liquide qu'ils prélèvent correspondent en réalité à plus de la moitié de la solution; il en résulte que les nombres des milligrammes de phosphore nucléinique obtenus dans le dosage sont supérieurs à la réalité.

Ou peut-être ils veulent rattraper la quantité du phosphore contenu dans la poudre perdue sur les parois du ballon et sur les billes de verre?

Tenant compte de toutes ces observations nous avons envisagé la méthode suivante pour les dosages de tous les formes de phosphore sur une même prise d'essai.

Méthode proposée par nous.

Les bacilles frais cultivés sur le milieu chimiquement indiqué page N° 10 furent partagés comme il suit:

I. Une quantité variant entre 0.100 gr. à 0.200 gr. est portée à l'étuve réglée entre 102°—105° la différence de poids perdue correspond à la quantité d'eau contenue dans les bacilles. On rapporte ce résultat à 100 grammes de bacilles frais.

Les bacilles secs qui résultent servent pour le dosage de phosphore total d'après la méthode indiquée par nous.

II. Une autre quantité des bacilles frais variant entre 4 à 8 grammes sert pour les dosages du phosphore: lipoïdique, organique soluble, nucléinique, minéral soluble et minéral insoluble.

a) *Dosage du phosphore lipoïdique.*

Les bacilles frais sont épuisés au moyen de l'alcool à 96° dans l'appareil à extraction continue de Kumagawa-Suto où la matière et le liquide d'épuisement se trouvent plongés dans la vapeur du solvant bouillante.

On fait l'extraction pendant 8 heures consécutives, puis on laisse refroidir, on fait le broyage des bacilles avec du sable de verre, on continue l'extraction encore une heure. Le liquide alcoolique est distillé sous pression réduite dans une fiole Kjeldahl de 200 cm^3, le résidu est déshydraté par deux affusions successives d'alcool absolu (25 cm^3 chaque fois) suivies chacune de la distillation de l'alcool.

On reprend alors à deux reprises le résidu déshydraté, par de l'éther anhydre (25 cm³ chaque fois). On ne compte comme phosphore lipoïdique que celui qui passe en solution éthérée. Le liquide éthéré est filtré dans une fiole Kjeldahl de 100 cm³, on distille l'éther, le résidu provenant de cette distillation est soumis à la destruction sulfo-nitrique et la liqueur obtenue sert au dosage du phosphore lipoïdique selon la méthode indiquée pour le dosage du phosphore total.

b) *Dosage du Phosphore organique soluble.*

Le résidu restant après les deux extractions par l'éther anhydre, plus le filtre qu'a servi pour la filtration de cet éther est soumis à la destruction sulfo-nitrique.

On a ainsi le phosphore organique soluble qu'on dose d'après notre méthode.

c) *Dosage du phosphore nucléinique.*

Les bacilles dont on a isolé les lipoïdes et qui se trouvent dans la cartouche de l'appareil de Kumagawa-Suto sont broyés encore une fois puis introduits dans un ballon Pyrex (250 cm³) à col court et à fond rond et muni d'un réfrigérent à reflux. On ajoute 50 cm³ d'une solution de chlorure de sodium à 15 gr. p. %, 2—3 billes de verre et on porte à une lente ébullition qu'on maintient pendant 20 minutes.

Pendant toute la durée de cette extraction chlorurée, on ramène dans le liquide par agitation les particules de matières qui sont soulevées par la mousse. On peut détruire la mousse par quelques gouttes d'alcool octylique. On retire le ballon, on ajoute environ 30 billes de verre et on remplace le réfrigérent par un bouchon fermant bien le ballon et on le soumet à une agitation mécanique pendant deux heures. On laisse macerer pendant 4 heures, on filtre sur un papier de filtre durci avec l'aide de la trompe à eau. Ce filtrat sert pour le dosage du phosphore nucléinique: On prend 25 cm³ de

cette solution dans un tube à centrifugation de 50 cm^3 et en agitant on ajoute 8—10 gouttes d'acide chorhydrique dilué de moitié. Il se forme un précipité nucléinique blanc qui flocule et gagne le fond du tube après une centrifugation de 30 minutes.

Nous avons renoncé à ajouter quelques gouttes de solution de nitrate d'argent à 5 p.% qui selon Javillier est susceptible de rassembler le précipité de substances nucléinique, pour ce motif que la présence de ce sel est une cause de gênes pour le dosage volumétrique.

On recueille le précipité qui surnage sur un filtre et on lave le tube à centrifugation et le filtre deux fois au moyen d'une pisette avec une solution de chlorure de sodium à 15 gr. p. %. Une partie du précipité nucléinique reste sur le filtre et l'autre se trouve au fond du tube de centrifugation.

Le précipité est dissout avec de l'acide sulfurique concentré et introduit dans une fiole *Kjeldahl,* on lave le tube à centrifugation avec l'eau distillée, on procède à la destruction au moyen du mélange sulfo-nitrique.

Ensuite on fait le dosage du phosphore nucléinique selon la méthode indiquée pour le dosage du phosphore total.

d) *Phosphore minéral soluble*

Le lique restant après la séparation du précipité nucléinique est détruit par le mélange sulfo-nitrique et sert pour le dosage de phosphore minéral soluble selon la méthode indiquée pour le dosage du phosphore total.

e) *Phosphore minéral insoluble.*

La masse bacillaire que reste après l'extraction par la solution de chlorure de sodium est détruit par le mélange sulfo-nitrique et sert pour le dosage du phosphore minéral insoluble.

Les résultats obtenus sont inscrits dans le *tableau* N° 7, calculés en p. % de bacilles secs.

Tableau N° 7.

Nature du milieu et age de la culture	Ph totale %	Ph lipoïd %	Ph orgsol %	Ph nucleiniq	Ph min. sol.	Ph min. insol.
Glycérine 20 jours	1024,2	139,88	28,—	103,5	513,75	237,5
Glycérine et Glucose 21 »	1129,52	140,—	33,1	132,1	505,1	325,52
Glucose 20 »	1349,46	146,8	45,—	175,46	470,3	516,46
Glycerine 40 »	1410,85	143,32	27,2	155,2	387,7	771,46
Glycerine et Glucose 41 »	1430,5	143,5	32,—	165,0	465,9	725,61
Glucose 40 »	1496,87	139,3	40,82	248,4	380,4	687,88

De l'exament de ce tableau se dégagent les conclusions suivantes:

1° En ce qui concerne le phosphore total on observe une augmentation progressive de cette forme de phosphore au cours de la croissance des bacilles, tandis que Javillier trouve qu'il y a diminution;

2° le pourcentage de phosphore total des bacilles développés sur les milieux glycérine-glucose et glucose seul est plus élevé que celui des bacilles cultivés sur le milieu glycériné.

Le même fait s'observe en ce qui concerne le phosphore lipoïdique, le phosphore nucléinique et le phosphore minéral insoluble, tandis que le taux du phosphore organique soluble et du phosphore minéral soluble décroissent avec l'âge de la culture.

Nous avons calculé en outre les diverses rapports phosphorés, ces résultats sont mentionnés dans le *tableau* N° 8.

De ce rapport on tire les conclusions suivantes:

1° Le 1er rapport décroit très légèrement avec l'âge de la culture, *Javillier* trouve qu'il y a augmentation.

2° Le 3^{e} rapport décroit très nettement avec l'âge de la culture, par contre le 2^{e}, le 4^{e} et le 5^{e} rapport crois-

Tableau N° 8.

	$\frac{\text{Ph lip}}{\text{Ph T}} \times 100$	$\frac{\text{Ph nuel}}{\text{Ph T}} \times 100$	$\frac{\text{Ph transition}}{\text{Ph T}} \times 100$	$\frac{\text{Ph insol}}{\text{Ph T}} \times 100$	$\frac{\text{Ph nuel}}{\text{Ph lip}} \times 100$
Glycérine 20 jours	13,67	10,2	55,2	23,18	73,27
Glyc. et Gluc. » »	12,4	11,7	47,6	22,8	94,35
Glucose » »	10,8	13,-	38,-	30,8	119,5
Glycérine 40 »	10,1	11,-	29,4	54,6	114,9
Glyc. et Gluc. » »	10,-	11,6	34,7	50,7	179,-
Glucose » »	9,1	17,3	28,1	45,9	182,2

sent sensiblement avec l'âge de la culture surtout le 4e et le 5e rapport. Les conclusions que nous avons tirées sont en accord avec ceux publiés par *Javillier* et *ses élèves* sauf en ce qui concerne le premier rapport et le 4e rapport. Dans le premier rapport, il trouve une augmentation et dans le 4e il trouve une diminution (1).

Tous ces différences proviennent de ce fait que d'après nos expériences, la teneur en phosphore total est plus élevée que celle indiquée par Javillier.

Dans des prochaines recherches nous nous proposons d'étudier la formation et la dépense de divers formes du phosphore au cours de développement du Grassbacillus II.

IV.

Variations de la teneur en matières grasses du Grassbacillus II avec la nature de l'aliment ternaire.

Mes recherches ont été effectuées sur des *Grassbacillus II* développés sur un milieu à la *Glycérine*, sur un milieu à la *Glycérine et Glucose* et enfin sur un milieu *Glucosé*. Les cultures étaient âgées de 20 jours et 40 jours.

Javilliers, H. Allaire et Mlle S. Rousseau. — Phosphore nucléinique et bilan phosphorés chez des Souris carencées en facteur liposoluble. Bul. Soc. Chim. Biologique T. x. 1928

Technique: Dosages des matières grasses par la méthode de Lemeland adaptée aux bacilles par Terroine et ses élèves.

a) Epuisement par l'alcool à 95° (dans l'appareil de Kumagawa-Suto). L'appareil de Kumagawa-Suto diffère du type Soxhlet en ce que la cartouche renfermant le produit à épuiser est placée dans le col du ballon c'est-à-dire dans les vapeurs mêmes du solvant et l'épuisement se fait donc à la température d'ébullition de celui-ci.

Les bacilles frais dont le poids est connu, sont placés dans la cartouche d'un appareil de Kumagawa-Suto et épuisés par l'alcool à 95° pendant 8 heures consécutives, puis les bacilles sont broyés avec du sable de verre, ensuite on procède à une nouvelle extraction alcoolique pendant une heure au moins. La masse bacillaire a été saponifiée ensuite directement au moyen de 50 cm^3 de potasse alcoolique 2 N.

Les solutions alcooliques sont évaporés à sec sous pression réduite.

b) *Saponification de l'extrait alcoolique.*

L'extrait alcoolique contenu dans le ballon extracteur a été traité par 25 cm^3 de potasse alcoolique 2 N. et chauffé au réfrigérant à reflux pendant deux heures sur un bain de sable. On cesse de chauffer le bain de sable pendant quelques minutes, puis on ajoute 20 cm^3 d'eau distillée (pour amener le titre alcoolique à 50° environ) et on chauffe à nouveau jusqu'à clarification complète, puis on laisse refroidir.

c) *Extraction de l'insaponifiable et dosage de la cholestérine.*

La solution alcoolique-alcaline est versée dans une ampoule à décantation et épuisée à trois reprises avec de l'éther de pétrole à P. E. inférieur à 70°, en utilisant successivement: 100 , 75 et 50 cm^3 de solvant. Après chaque agitation, on laisse reposer jusqu'à séparation

complète des liquides et on recueille dans une même ampoule les solutions éthérées qu'on lave avec de l'eau distillée. Cette eau est séparée et ajoutée à la solution alcoolique-alcaline qui renferme les acides gras, tandis que l'insaponifiable se trouve dans la solution éthérée. La solution éthérée est distillée au bain-marie électrique dans le vide et le résidu est repris par de l'éther de pétrole sec bouillante au-dessous de 50°. On laisse reposer 4 heures pour séparer les impuretés, on filtre sur un filtre d'amiante et sable dans un petit ballon taré, on distille dans le vide, puis on évapore toujours dans le vide à 50° jusqu'à poids constant.

Le poids obtenu est l'insaponifiable total.

Dosage de la cholestérine (*méthode de Windaus*).

Dans ce but l'insaponifiable est dissous à l'ébullition par 10 cm³ d'alcool absolu, puis on ajoute 10 cm³ d'une solution de digitonine à 1 % dans l'alcool absolu. On chauffe de nouveau à l'ébullition pendant une minute, puis on ajoute 2 cm³ d'eau distillée qui abaisse le titre d'alcool entre 95° à 90°. On voit apparaître un précipité blanc qui est recueilli sur un filtre taré après un repos de 24 heures. Le précipité est lavé d'abord à l'alcool à 95° de 2 à 3 fois, puis plusieurs fois à l'éther sec. On sèche à 100° pendant 1/4 d'heure puis on pèse. Ce poids représente le complexe digitonine-cholestérine; en le multipliant par le facteur 0,2431 on obtient le poids de la cholestérine contenue dans la prise d'essai.

d) *Extraction des acides gras.*

La solution alcoolique-alcaline qui reste après la séparation de l'insaponifiable est acidulée par addition d'acide chlorhydrique en présence d'un indicateur (méthylorange); les acides gras ainsi libérés se trouvent dans une solution alcoolique dont le titre a été abaissé par l'acide et l'eau à 25° environ, passent facilement dans l'éther de pétrole à P. E. au-dessous de 70°. On fait trois épuisements par: 100, 75 et 50 cm³ d'éther de

pétrole, puis les extraits éthérés réunis sont lavés à l'eau pour éliminer l'acide entraîné et évaporés dans le vide. Le résidu est repris par l'éther de pétrole P. E. au-dessous de 50°, on filtre, on évapore dans le vide, on sèche dans le vide en opérant à la température de 50° pendant une heure et on pèse.

On a ainsi le poids des acides gras.

2° *Indice d'iode* (*Méthode de Wiys*).

Cet indice a été recherché par la méthode de Wiys: on dissout les acides gras dans du tétrachlorure de carbone, on ajoute à la solution 20 cm³ d'une solution acétique de monochlorure d'iode, on agite et on laisse reposer deux heures puis on ajoute 20 cm³ d'une solution de iodure de potassium à 10 % et on titre l'iode non combiné au moyen de l'hyposulfite de sodium N/10 en présence d'empois d'amidon comme indicateur; on opère comparativement avec un témoin. Le calcule d'indice d'iode se fait d'après la formule: $\frac{X \times 100}{p} = i$

X = quantité d'iode fixé, P = quantité des acides gras mis en expérience, I = *indice d'iode.*

Le *point de fusion* a été déterminé par la méthode de *Thiele.*

Pour la détermination de *l'indice de saponification* j'ai utilisé la méthode de *Kœstorfer:* Dans une fiole Erlenmeyer de 150 cm³ on pèse une quantité connue d'acides gras, puis on ajoute une solution N/2 de potasse alcoolique. Dans une autre fiole, on fait un essai comparatif. On chauffe chacune de ces fioles pendant 1/4 d'heure ou réfrigérant à reflux au bain-marie, puis on fait le titrage de la potasse non combinée à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique N/2.

J'ai substitué dans mes recherches les solutions à N/2 par des solutions à N/4 en faisant les calcules nécessaires. L'indicateur est une solution de phénolphtaline à 1 %. Supposons que dans la fiole témoin il ait fallu

A cm³ d'acide chlorhydrique et que dans la fiole contenant les acides gras il ait fallu B cm³ de solution N/2 d'acide chlorhydrique, p = poids de substance mise en expérience. On a $\frac{(A-B)}{p} 56{,}1$ = indice de saponification exprimé en milligrammes de potasse.

Il est préférable de se servir d'alcool absolu pour la préparation de la solution de potasse, on empêche ainsi l'hydrolyse des savons formés.

L'indice d'acidité a été déterminé en se servant d'une solution N/10 de soude, d'une solution d'acide sulfurique N/10 en présence de phénolphtaleine comme indicateur. L'indice d'acidité est donné par la formule: $\frac{n \times 5{,}6}{p}$ (n étant le nombre de cm³ de soude N/10 employés, et p: le poids en grammes de l'extrait alcoolique).

Les résultats obtenus sont inscrits dans le tableau n° 9. L'inspection de ce tableau montre qu'en substituant le glucose à la glycérine en quantités équivalentes en carbone, les autres conditions restant identiques, il y a abaissement de la teneur en matières grasses par rapport à celle des bacilles cultivés sur milieu glycériné.

Cette diminution a été observée par *Terroine* et *Lobstein* dans les bacilles tuberculeux.

En ce qui concerne les bacilles cultivés sur milieu glycériné et glucosé, on voit très bien que leur teneur en matières grasses est intermédiaire entre celle des bacilles cultivés sur le milieu glycériné et celle des bacilles cultivés sur milieu glucosé. On voit aussi que la teneur en matière grasse des bacilles cultivés sur les trois milieux indiqués plus haut passe par un maximum et décroit ensuite. Ce fait a été d'ailleur indiqué par Aronsohn et Lobstein.

Nous pouvons constater aussi que la teneur ln cholestérine du Grassbacillus II est presque le double de celle observée par Lobstein pour le bacille tuberculeux. —

Tableau N° 9.

Nature du milieu Age de la culture	Glycérine		Glycérine et Glucose		Glucose	
	20 jours gr.	40 jours gr.	20 jours gr.	40 jours gr.	20 jours gr.	40 jours gr.
Poids des bacilles frais mis en expérience	6,1161	6,3014	4,5645	5,6972	5,4405	4,6104
Poids des bacilles secs	1,1494	1,1504	0,8369	1,0002	1,169	0,9337
Acides gras	0,2212	0,1940	0,1315	0,1073	0,1117	0,0582
Insaponifiable totale	0,1287	0,0897	0,0751	0,0894	0,0885	0,0756
Cholestérine	0,0109	0,0071	0,0037	0,0028	0,00409	0,00149
Indice d'iode	19,02	18,32	18,5	17,65	16,02	15,35
Point de fusion	40,2	40,—	41,5	41,5	41,9	42,3
Indice de saponification	56,26	31,2	51,2	36,6	20,67	—
Indice d'acidité	30,2	26,3	29,75	25,2	28,5	24,8
Acides gras % de bacilles secs	19,25	15,87	15,73	10,73	9,56	6,24
Insaponifiable % de bacilles secs	11,2	7,80	9,98	9,56	7,56	8,10
Cholestérine % de bacilles secs	0,95	0,62	0,45	0,28	0,35	0,16

Indice caractéristique des acides gras.

Le dosage de l'indice d'iode effectué sur les graisses provenant des milieux glycérine et glycérine et glucose, nous montre au point de vue qualitatif que ces graisses renferment une proportion légèrement plus grande d'acides gras non saturés que les graisses provenant du milieu glucosé.

CONCLUSIONS

Nutrition du Bacille. — Pour la nutrition minérale du Grassbacillus II et son accroissement régulier, le phosphore, le soufre, le potassium et le magnésium sont nécessaires dans des proportions déterminées (peut-être existe-t-il dans les produits purs que nous avons employés d'autres minéraux à l'état des traces chimiquement indécelables).

Le sodium ne peut remplacer le potassium, parce que il y a par suite de cette substitution, diminution très sensible dans le poids des bacilles secs ou frais obtenus.

b) Comme *aliment azoté* les substances organiques telles que le citrate, le tartrate ou le succinate d'ammonium, mais surtout l'asparagine ou l'acide aspartique se sont montrées beaucoup plus favorables que les autres substances minérales essayées, c'est-à-dire: le sulfate ou l'azotate d'ammonium et l'azotate de potassium. On peut dire que ces deux derniers sels sont des poisons pour ces bacilles.

L'acide du groupement carboxyle-aminé commun à tous les acides aminés, pasaît être mieux consommé par le Grassbacillus II.

L'Urée en faibles proportions peut être un bon aliment sans toutefois donner d'abondantes récoltes, elle a une action retardatrice à la dose de 4 gr. par litre de liquide nutritif.

c) La glycérine n'est pas un aliment ternaire indispensable au bon développement du Grassbacillus II.

Les alcols polyatomiques (érytrite, mannite) les hexobioses (saccharose, lactose) sont consommés par le Grassbacillus II, tandis que le bacille tuberculeux ne les consomme qu'en très faibles quantités.

Les polysaccharides sont très peu utilisés. On peut expliquer ce phénomène par la constitution stéréochimique qui paraît jouer un rôle important dans leur valeur alimentaire; en effet. parmi les hexoses, le fructose ne produit qu'un faible développement des bacilles.

d) Avec le glucose, le développement du Grassbacillus II est moins prononcé qu'avec la Glycérine, à équivalence d'apport de carbone.

e) Un mélange de glycérine et de glucose, à parties égales, n'est pas aussi favorable au développement de ces bacilles que la glycérine seule, mais est préférable au glucose employé seul.

f) La réaction optima du liquide nutritif dépend de l'aliment donné: ainsi l'Asparagine, aliment azoté, la culture se développe plus rapidement et plus abondamment, si la réaction initiale du milieu est acide; si la réaction initiale est neutre ou alcaline, le développement ne se montre qu'après acidification du milieu.

II. Influence de l'âge et de la composition du milieu sur la composition chimique du bacille.

a) Au cours de son développement, le Grassbacillus II accuse une diminution de la teneur en azote d'une part, d'autre part une augmentation de la teneur en eau, jusqu'au moment où la culture atteint son plein développement et cesse de s'accroître. A ce moment, la culture s'immerge; il y a diminution du poids du bacille qui s'hydrate; il y a autolyse et perte d'azote.

b) La teneur du bacille en matières grasses n'est pas constante; elle varie en fonction de l'aliment donné. Elevée sur des milieux glycérinés, elle diminue d'environ 50% lorsque on substitue le glucose à la glycérine (à équi-

valence de carbone). Dans le cas où la glycérine est remplacée par du glucose, à parties égales, on trouve un taux de la matière grasse intermédiaire d'une part entre celui trouvé dans les bacilles cultivés sur les milieux glucosés et d'autre part dans les bacilles cultivés sur les milieux glycérinés.

Nous avons constaté sur les trois milieux: glycériné, glucosé, et glycériné et glucosé un taux de matières grasses inférieur à celui signalé par Lobstein dans le bacille tuberculeux.

En ce qui concerne la qualité de matières grasses nous n'avons pas observé de différences appréciables; l'indice d'iode est un peu plus élevé, quand l'aliment ternaire est la glycérine.

Le taux de l'insaponifiable est variable mais il est supérieur à celui constaté par Lobstein dans le bacille tuberculeux.

En ce qui concerne la cholestérine, ce corps n'existe qu'en quantités minimes 0,16 — 0,95 pour cent grammes de bacilles secs. Nous avons observé que le taux de la cholestérine rapporté à 100 grammes de bacilles secs est plus élevé sur le milieu glycériné et sur les milieux glycérinés-glucosés, que sur le milieu glucosé. *Lobstein* a fait la même constatation pour le bacille tuberculeux.

La source d'azote demeurant la même en qualité et en quantité, la nature de l'aliment hydrocarboné qui provoque une diminution du taux des matières grasses, produit un accroissement en azote dans la teneur du Grassbacillus II, de telle sorte que les matières grasses, les substances protéiques s'équilibrent et que leur somme demeure sensiblement la même quel que soit l'aliment ternaire utilisé.

c) La teneur du Grassbacillus II en azote varie avec la quantité et la nature de l'aliment azoté, les autres composants demeurant les mêmes.

d) La teneur du Grassbacillus II, en matières albuminoïdes est en fonction de l'aliment hydrocarboné donné aux bacilles.

Nous avons observé que le taux des matières albuminoïdes augmente si on remplace la moitié de la glycérine par du glucose et surtout si la totalité de la glycérine est remplacée par du glucose.

e) La teneur du bacille en matière phosphorée est très variable. Nous avons constaté que le phosphore total, le phosphore lipoïdique, le phosphore nucléinique et le phosphore minéral insoluble dépendent de la nature de l'aliment hydrocarboné; par exemple si on remplace la moitié de la glycérine par du glucose et surtout si on remplace la totalité de la glycérine par du glucose. il y a une augmentation de la teneur de tous les formes de phosphore citées ci-dessus.

En outre le taux de ces diverses formes de phosphore croît au cours du développement du Grassbacillus II, tandis que le phosphore organique soluble et le phosphore minéral soluble diminuent avec l'âge de la culture.

Strasbourg, le 14 Juin 1930

Le Président de la Thèse,

E. LABORDE.

Vu et approuvé:
Strasbourg, le 16 Juin 1930

Le Doyen
de la Faculté de Pharmacie
F. JADIN.

Vu et permis d'imprimer:
Strasbourg, le 17 Juin 1930

Le Recteur d'Académie,
Président du Conseil de l'Université,
Ch. PFISTER.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

Chapitre I.

ARNAUD et CHARRIN. — C. R. Ac. Sc. 1891, C XII, p. 755 et 1157.

BAUDRAN. — C. R. Ac. Sc., 1909. CCXLIX, p. 874; — 1910, CL, p. 1200.

BERTRAND G. — C. R. Ac. Sc. 1902, CXXXIV, p. 1434, et CXXXV, p. 809; 1903, CXXXVI, p. 1083 et CXXXVII, p. 265; — 1912 CLIV, p. 381 et 616. — 1913, CLVII, p. 149, — Bull. Sc. pharmacologie, 1906 XIII, p. 651, — 1911, XVIII, p. 193; — 1912 XIX, p. 193 et 321; 1913, XX, p. 41, — Bull. Soc. Chimique 1911, IX, p. 361, — Etude biochimique de la Bactérie du Sorbose. Thèse Doct. ès-science, Paris 1904.

BERTRAND et JAVILLIER. — C. R. AC. Sc. 1911, CLI, p. 225 et 900; CLII, p. 225, 900 et 1337. — Bull. Soc. Chimique, 1912, XI, p. 212, 347, 400 et 494. — Bull. Sc. pharmacolog. 1911, XVIII, p. 65 et 321.

BEZANÇON, PHILIBERT et BOUDIN. — Bull. Soc. Etudes scientifiques sur la Tuberculose 1913, N° 1, p. 1.

BORREL de COULON, BOEZ, GUIMAUD. — C. R. Soc. Biologie, 1922, LXXXVI, p. 388.

CALMETTE, MASSOL et BRETON. — C. R. Soc. Biologie, 1909, LXVII, p. 580.

COUPIN. — C. R. Ac. Sc. 1903, CXXXVI, p. 392, 1913, CLVII, p. 1075.

DEHERAIN. — Traité chimie agricole, 1902, p. 647 et 661.

DELILLE, MAYER, SCHÆFFER et TERROINE. — C. R. Ac. Sc. 1912, CLIV, p. 537. C. R. Soc. Biologie, 1913, LXXIV, p. 272. — Revue de la Tuberculose. Février 1914.

FREIMUTH. — Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, 1901, Bd. XXIX, p. 530—531.

FROUIN. — C. R. Soc. Biologie: 1910, LXVIII, p. 801 et 915; — 1922 LXXII, p. 1034, et LXXIII, p. 640; — 1913, LXXIV, p. 1184, 1920, LXXXIII, p. 756.

GAUTIER A. — L'alimentation et les régimes, 1904, Masson, édit., Paris.

GRIMBERT. — Fermentation anaérobe produit par le bacille orthobutylicus; ses variations sous certaines influences bio-

logiques: Thèse Doct. ès-sciences. Paris 1893, Archiv de parasitologie, 1898, I, p. 191. — Diagnostic des Bactéries, Thèse Méd., Paris, 1903.

JAVILLIER. — C. R. Ac. Sc., 1907, CXLV, p. 121; — 1908, CXLVI, p. 365; 1911, CLII, p. 1337, et CLIII, p. 1177; — 1912, CLIV, p. 383, et CLV p. 190 et 1551, 1913, CLVI, p. 406 et CLVII, p. 1113; 1914, CLVIII, p. 140 et 1216. — Recherches sur la présence et le rôle du zinc chez les végétaux. Thèse Doct. ès-sciences, Paris, 1908.

LEPIERRE. — C. R. Ac. Sc. 1913, CLVI, p. 258, 409, 1179, 1489, et CLVII, p. 876; — 1914 CLVIII, p. 67.

LOBSTEIN E. — Recherches biochimiques sur le Bacille Tuberculeux. Thèse Doct. ès-sciences. Strasbourg, 1922.

MŒLLER ALFRED. — Deutsche Med. Wochenschr. 1898. Leipzig, p. 376—379. Centralbl. Bakt. Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. Bd. 25. 1899. p. 369—373, 1901, Bd. 30, p. 513—523.

MOLLIARD. — Cours professé à la Sorbonne.

OUCHINSKY. — Archiv. Méd. expériment. 1893, V. p. 293. Centralbl. für Bakt. 1893, XVI, p. 316.

PICHARD. — C. R. Ac. Sciences, 1884, XCVIII, p. 1289; — 1889, CIX, p. 445; — 1891, CXII, p. 1455.

RAULIN. — Etudes chimiques sur la végétation, Ann. des Sc. naturelles. Bot. 5e Série, XI, 1869.

SAUTON. — C. R. Ac. Sc., 1912, CLV, p. 860; — C. R. Soc. Biologie, 1913, LXXIV, p. 1268; — Congrès international de Chimie appliquée, 1912, XIX, p. 267.

VAILLANT. — C. R. Soc. Biologie, 1906, LVIII, p. 741.

Chapitre II.

BELIN P. — Méthode de dosages des acides grass, Bull. Soc. Chimie biologique, 1926, VIII. p. 1081—1102.

KUMAGAWA-SUTO. — Biochemische Zeitschrift, 1908, VIII, p. 212; — Handbuch der Biochemischen Arbeitsmethoden. Bd. V. I. Teil 1911, p. 477—488.

LEMELAND P. — Bull. Soc. Chimie biologique, 1921, III, p. 134; 1922 IV, p. 300. 1923. V. p. 110. — C. R. Soc. Biologie, 1922, LXXXVII, p. 500. —

LOBSTEIN. — Recherches biochimiques sur le Bacille Tuberculeux, Thèse Doct. ès-sciences. Strasbourg 1922.

JAVILLIER et H. ALLAIRE. — Bull. Soc. Chimie biologique, 1925, VII, p. 486. — 1926, VIII, p. 924; — 1927, IX, p. 772.

JAVILLIER, H. ALLAIRE et Mme HINGLAIS. — Bull. Sc. Pharmacologique, 1925, XXXII, p. 641—659.

JAVILLIER, H. ALLAIRE et Mlle S. ROUSSEAU. — 1927, IX, p. 778; — 1928, X, p. 294.

JAVILLIER et Mlle A. CREMIEU et Mme HINGLAIS. — 1928; — X, p. 327.

JAVILLIER et Mlle CREMIEU. — 1928, X, p. 338.

JAVILLIER. — Bull. Soc. Chimie Biologique. — 1929 — XI, p. 644; Phosphore nucléique des tissus et sa détermination quantitative Conférence.

MACHEBŒUF. — Bull. Soc. Chimie biologique, 1926, VIII, p. 464.

SCHIMIDZU. — Biochemische Zeitschr. 1910, XXVIII, p. 337 à 273.

TERROINE. — Contribution à la connaissance de la physiologie des substances grasses et lipoïdiques, Thèse Doct. ès-scienes. Paris. 1919. — Ann. des Sc. naturelles, Zoologie, 10e Série, 1919, p. 1—397.

TERROINE, WURSMSER et MONTANÉ. — Bull. Soc. Chimie 1923, V., p. 182—199.

TERROINE, WURMSER et MONTANE. — Bull. Soc. Chimie biologique, 1922, IV. p. 623—643.

WINDAUS. — Zeitschr. für Physiol. Chem. 1910, LXVIII, p. 110—117.

VOIT. — Zeitschr. für Biol., 1926, 84, 153—168.

TABLE DES MATIERES.

Chapitre I.

Page

Introduction 7
Culture du Grassbacillus II, sur milieu chimiquement défini 11
Recherches personnelles: 17
1) Composition du milieu 17
2) Influence de la réaction du milieu 19
3) Valeur comparative de divers composés azotés ... 21
4) Valeur comparative de divers hydrates de Carbone 25
Alcools polyatomiques: Erythrite .....
Manite .....
Hexoses: Glucose 26
Fructose .....
Hexobioses: Saccharose 27
Lactose .....
Polysaccharides: Amidon 28
Dextrine .....

Chapitre II.

Recherches personnelles: 29
1) Variations des proportions d'eau et d'azote dans le Grassbacillus II, au cours de son développement .. 30
2) Variation de la teneur du Grassbacillus II en azote avec la nature et la concentration de l'aliment azoté 32
3) Variations de la teneur du Grassbacillus II en azote avec la réaction du milieu 33
4) Variations de la teneur du Grassbacillus II en matières albuminoïdes avec la nature de l'aliment ternaire 34
5) Variations suivant la nature de l'aliment ternaire de la teneur du Grassbacillus II en phosphore total c'est à dire: phosphore lipoïdique, phosphore nucleinique, phosphore organique soluble et Phosphore minérale soluble et insoluble 36
6) Variations de la teneur du Grassbacillus II en matières grasses avec la nature de l'aliment ternaire 50
Conclusions 57
Index Bibliographique 61

Imprimerie « SOSTRALIB » Strasbourg.